

AE

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 5 月 23 日 (23.05.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/40659 A1

(51) 国際特許分類: C12N 9/24, 15/56, 1/21, C12P 19/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/10044

(22) 国際出願日: 2001 年 11 月 16 日 (16.11.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2000-350142
2000 年 11 月 16 日 (16.11.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 林原生物化学研究所 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 Okayama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 久保田倫夫 (KUBOTA, Michio) [JP/JP]; 丸田和彦 (MARUTA, Kazuhiko) [JP/JP]; 山本拓生 (YAMAMOTO, Takuo) [JP/JP]; 福田恵温 (FUKUDA, Shigeharu) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社 林原生物化学研究所内 Okayama (JP).

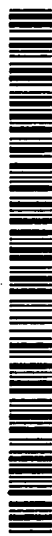
(81) 指定国 (国内): JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: POLYPEPTIDES HAVING α -ISOMALTOSYL TRANSFERASE ACTIVITY

WO 02/40659 A1

(54) 発明の名称: α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチド

(57) Abstract: It is intended to provide polypeptides which are usable in a process for producing a cyclic tetrasaccharide having the structure of cyclo{ \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow)}; DNAs encoding these polypeptides; and use thereof. This object can be achieved by providing polypeptides, which have an enzymatic activity of forming a cyclic tetrasaccharide having the structure of cyclo{ \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow)} by transferring α -isomaltosyl from a saccharide having an α -1,6-glucosyl bond as the binding manner at the non-reducing end and an α -1,4-glucosyl bond as the binding manner other than at the non-reducing end and having a degree of glucose polymerization of 3 or more and have an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or 2 in Sequence Listing or an amino acid sequence derived therefrom by deletion, substitution or addition of one or more amino acids, DNAs encoding these polypeptides and use thereof.

[続葉有]



(57) 要約:

本発明は、サイクロ { $\rightarrow 6$ } - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 3$) - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 6$) - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 3$) - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow$) の構造を有する環状四糖の製造方法に用いることのできるポリペプチド、当該ポリペプチドをコードする DNA とその用途を提供することを課題とし、非還元末端の結合様式として α - 1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α - 1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質から、 α - イソマルトシル転移することによって、サイクロ { $\rightarrow 6$ } - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 3$) - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 6$) - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 3$) - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow$) の構造を有する環状四糖を生成する酵素活性を有し、かつ、配列表における配列番号 1 又は 2 に示すアミノ酸配列若しくは、そのアミノ配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチド、当該ポリペプチドをコードする DNA とその用途を確立することにより前記課題を解決するものである。

明 細 書

α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチド

5 技術分野

本発明は、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から、サイクロ $\{\rightarrow 6\}-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1 \rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1 \rightarrow 6)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1 \rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1 \rightarrow \}$ の構造を有する環状四糖を生成する酵素活性を有し、かつ、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列若しくは、それらのアミノ配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチドとその用途に関する。より詳細には、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から、サイクロ $\{\rightarrow 6\}-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1 \rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1 \rightarrow 6)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1 \rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1 \rightarrow \}$ の構造を有する糖質を生成する酵素活性を有し、かつ、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列若しくは、それらのアミノ配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチド、当該ポリペプチドをコードするDNA、当該ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNA、当該組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体、当該ポリペプチド

ドの製造方法、および前記特定の構造を有する糖質とその用途に関するものである。

背景技術

- 5 グルコースを構成糖とする糖質、例えば、澱粉を原料として製造される部分分解物としては、アミロース、アミロデキストリン、マルトデキストリン、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖などが知られている。これらの糖質は、通常、分子の両端が非還元末端と還元末端とからなり、還元性を示すことが知られている。一般に、澱粉部分分解物の場合、固
- 10 形物当たりの還元力の大きいものは、通常、低分子、低粘度、高甘味である。また、高反応性が高いことからアミノ酸や蛋白質などのアミノ基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起し易く、褐変して悪臭を発生し、品質が劣化し易い欠点のあることが知られている。従って、還元性糖質
- 15 しくは消滅させる方法が古くから望まれていた。例えば、『ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー (Journal of American Chemical Society)』、第71巻、353乃至358頁(1949年)に開示されているように、澱粉にマセランス・アミラーゼ (macerans amylase) を作用させる
- 20 ることにより、6、7または8個のグルコース分子が α -1, 4グルコシル結合した α -、 β -または γ -環状デキストリンを生成させる方法が知られている。現在では、澱粉からこれら環状デキストリンが工業的規模で生産され、これら環状デキストリンがそれぞれ有する、非還元性、無味、包接能などの特性を生かして種々の用途に用いられている。また、
- 25 先に、本出願人が、特開平7-143876号公報、特開平7-213283号公報などで開示したように、マルトオリゴ糖など澱粉部分分解

物に非還元性糖質生成酵素およびトレハロース遊離酵素を作用させることにより、2個のグルコース分子が α 、 α -結合したトレハロースを生成させる方法も知られている。現在では、トレハロースは澱粉から工業的規模で生産され、その非還元性と温和で高品質な甘味特性を生かして
5 種々の用途に用いられている。このように、グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、グルコース重合度2のトレハロース、グルコース重合度6、7および8の α -、 β -および γ -環状デキストリンは、それぞれの特性を生かして工業的規模で生産され利用されているものの、これら糖質とは性質性状の異なる更なる非還元性糖質乃至低還元性糖質
10 の提供が望まれる。

一方、近年、グルコースを構成糖とする新たな環状構造の四糖類が開示された。例えば、『ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry)』、第226巻、641乃至648頁(1994年)には、主として、グルコース残基が α -1, 3結合と α -1, 6結合とが交互に連なるアルテルナン (alternan) に、加水分解酵素アルテルナーゼ (alternanase) を作用させることによりサイクロ { \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-
15 グルコピラノシル-(1 \rightarrow)} の構造を有する環状四糖 (以下、特にことわらない限り、本願明細書では本糖質を「環状四糖」と呼ぶ。) を生成させ、これをメタノール共存下で晶出させることが開示されている。環状四糖は、環状構造を有し、非還元性の糖質ゆえに、包接能を示し揮発性有機物を安定化する作用を有し、アミノカルボニル反応を起こさず、褐
20 変、劣化を懸念することなく利用、加工できることが期待される。しかしながら、環状四糖の製造に必要な原料のアルテルナンや酵素のアルテ

ルナナーゼの入手が困難であり、加えて、その酵素を産生する微生物も入手困難であった。

斯かる状況に鑑み、本発明者等は、工業的实施が容易な環状四糖の新規製造方法につき鋭意研究したところ、バチルス属又はアルスロバクター属に属するある種の微生物が、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から環状四糖を生成するという、従来未知の全く新規な酵素、 α -イソマルトシル転移酵素を産生することを見出し、PCT/JP01/04276号明細書に開示した。更に、これら微生物が、グルコース重合度2以上の澱粉糖から、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度3以上の糖質を生成する新規酵素、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素をも産生することを見出し、PCT/JP01/06412号明細書に開示した。そして、これら α -イソマルトシル転移酵素と α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とを用いることにより、グルコース重合度2以上の澱粉糖から環状四糖を生成し得ることを見出した。しかしながら、これら微生物はいずれも α -イソマルトシル転移酵素の産生量が充分でなく、環状四糖を大規模に製造しようとすると、微生物を大量に培養しなければならないという問題があった。

一方、今日では分子生物学が発展し、酵素の本質がポリペプチドであり、それを構成するアミノ酸配列がその酵素活性を左右するものであり、そのアミノ酸配列は遺伝子DNAによりコードされていることが明らかにされている。即ち、ポリペプチドをコードする遺伝子を単離し、その塩基配列を解明できれば、そのポリペプチドをコードするDNAを含む組換えDNAを作製し、これを微生物や動植物の細胞に導入して、得ら

れる形質転換体を培養することにより、比較的容易に所望量のポリペプチドが取得できるようになった。

斯かる状況に鑑み、上記 α -イソマルトシル転移酵素の本質であるポリペプチドをコードする遺伝子を単離し、その塩基配列を解明し、斯かる構造の解明されたポリペプチドを遺伝子組換え技術により、大量、安価、安定に供給するのが急務となっている。

発明の開示

本発明の第一の課題は、非還元末端の結合様式として α -1, 6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から環状四糖を生成する α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチド(以下、「本発明のポリペプチド」と略記することもある。)を創製することである。

本発明の第二の課題は、本発明のポリペプチドをコードするDNAを提供することにある。

本発明の第三の課題は、斯かるDNAを含む複製可能な組換えDNAを提供することにある。

本発明の第四の課題は、斯かる組換えDNAを導入した形質転換体を提供することにある。

本発明の第五の課題は、斯かる形質転換体を利用する、本発明のポリペプチドの製造方法を提供することにある。

本発明の第六の課題は、本発明のポリペプチドを利用する、非還元末端の結合様式として α -1, 6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有しているグルコース重合度が3以上の糖質から環状四糖を生成する方法を提供することにある。

ある。

本発明の第七の課題は、本発明のポリペプチドを用いて得られる環状四糖とその用途を提供することにある。

本発明は、前記第一の課題を、非還元末端の結合様式として $\alpha-1,6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1,4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から、 α -イソマルトシル転移することによって、サイクロ $\{\rightarrow 6\}-\alpha-D$ -グルコピラノシル- $(1\rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル- $(1\rightarrow 6)-\alpha-D$ -グルコピラノシル- $(1\rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル- $(1\rightarrow)$ の構造を有する環状四糖を生成する酵素活性を有し、かつ、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列若しくは、それらのアミノ配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチドにより解決するものである。

15 本発明は、前記第二の課題を、当該ポリペプチドをコードするDNAにより解決するものである。

本発明は、前記第三の課題を、当該ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能なDNAにより解決するものである。

20 本発明は、前記第四の課題を、当該ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体により解決するものである。

本発明は、前記第五の課題を、当該ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜
25 宿主に導入してなる形質転換体を培養し、その培養物から前記ポリペプチドを採取してなる当該ポリペプチドの製造方法により解決するもので

ある。

本発明は、前記第六の課題を、非還元末端の結合様式として $\alpha-1$,
6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1$,
4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質に本発明の
5 ポリペプチドを作用させて環状四糖を生成させる工程を含んでなる環状
四糖の製造方法により解決するものである。

更に、本発明の第七の課題を、本発明のポリペプチドを用いて得られ
る環状四糖を製造し、斯かる環状四糖又はこれを含む混合糖質を含有せ
しめた飲食物、消し用品、医薬品などの組成物を提供することにより解
10 決するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、バチルス グロビスポルス C 1 1 由来の α -イソマルトシ
ル転移酵素活性を有するポリペプチドの至適温度を示す図である。

15 第2図は、バチルス グロビスポルス C 1 1 由来の α -イソマルトシ
ル転移酵素活性を有するポリペプチドの至適 pH を示す図である。

第3図は、バチルス グロビスポルス C 1 1 由来の α -イソマルトシ
ル転移酵素活性を有するポリペプチドの熱安定性を示す。

第4図は、バチルス グロビスポルス C 1 1 由来の α -イソマルトシ
20 ル転移酵素活性を有するポリペプチドの pH 安定性を示す図である。

第5図は、バチルス グロビスポルス N 7 5 由来の α -イソマルトシ
ル転移酵素活性を有するポリペプチドの至適温度を示す図である。

第6図は、バチルス グロビスポルス N 7 5 由来の α -イソマルトシ
ル転移酵素活性を有するポリペプチドの至適 pH を示す図である。

25 第7図は、バチルス グロビスポルス N 7 5 由来の α -イソマルトシ
ル転移酵素活性を有するポリペプチドの熱安定性を示す。

第8図は、バチルス グロビスポルス N75 由来の α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの pH 安定性を示す図である。

第9図は、本発明による組換え DNA 『pBGC1』の制限酵素地図を示す図である。図中、黒い太線で示した部分は、バチルス グロビスポルス C11 由来の本発明の α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA である。

第10図は、本発明による組換え DNA の『pBGN1』の制限酵素地図を示す図である。図中、黒い太線で示した部分は、バチルス グロビスポルス N75 由来の本発明の α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドをコードする DNA である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、非還元末端の結合様式として α -1,6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1,4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から環状四糖を生成する、従来未知の全く新規な酵素の発見に基づくものである。斯かる酵素は、本発明者等が土壌から単離した新規微生物 C11 株及び N75 株の培養物からポリペプチドとして得ることができる。C11 株は、下記の性質を有しており、本発明者等は本菌を新規微生物バチルス グロビスポルス C11 と命名し、平成12年4月25日付で日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託され、受託番号 FERM BP-7144 として受託された。又、N75 株は、下記の性質を有しており、本発明者等は本菌を新規微生物バチルス グロビスポルス N75 と命名し、平成13年5月16日付で日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託され、受託番号 FERM BP-7591 として受託された。なお、C11

- 株及びN75株は、本発明者等がPCT/JP01/06412号明細書で開示した如く、グルコース重合度2以上の澱粉糖から、非還元性末端の結合様式として $\alpha-1,6$ グルコシル結合を有し、この非還元性末端以外の結合様式として $\alpha-1,4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度3以上の糖質を生成する酵素、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素をも産生する。

<バチルス グロビスポルス C 1 1 株>

A 細胞形態

肉汁寒天培養 (27℃)

- 通常0.5乃至1.0×1.5乃至5μmの桿菌。多形性なし。運動性あり。球形の孢子を細胞内の端に形成。膨潤した孢子嚢を形成。グラム陽性。

B 培養性質

(1) 肉汁寒天平板培養 (27℃)

形状：円形 大きさは2日間で1乃至2mm。

- 15 周縁：全縁

隆起：半レンズ状

光沢：鈍光

表面：平滑

色調：不透明、淡い黄色

- 20 (2) 肉汁寒天斜面培養 (27℃)

生育：中程度

形状：放散状

(3) 肉汁ゼラチン穿刺培養 (27℃)

液化する。

- 25 C 生理学的性質

(1) VP試験：陰性

- (2) インドールの生成：陰性
- (3) 硝酸からのガス生成：陽性
- (4) 澱粉の加水分解：陽性
- (5) 色素の生成：可溶性色素の生成はない
- 5 (6) ウレアーゼ：陽性
- (7) オキシダーゼ：陽性
- (8) カタラーゼ：陽性
- (9) 生育の範囲：pH 5.5乃至9.0
温度 10乃至35℃
- 10 (10) 酸素に対する態度：好気性
- (11) 炭素源の利用性と酸生成の有無
- | | 利用性 | 酸生成 |
|----------|------|-----|
| D-グルコース | 利用する | 陽性 |
| グリセロール | 利用する | 陽性 |
| 15 スクロース | 利用する | 陽性 |
| ラクトース | 利用する | 陽性 |
- (14) DNAのGC含量：39%

<バチルス グロビスポルス N75株>

20 A 細胞形態

(1) 肉汁寒天培養、27℃

通常0.5乃至1.0 μm \times 1.5乃至5 μm の桿菌。多形性なし。
運動性あり。球形の孢子を細胞内の端に形成。膨潤した孢子嚢を形成。
グラム陽性。

25 B 培養性質

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状：円形、大きさは2日間で1乃至2 mm

周縁：全縁

隆起：半レンズ状

光沢：鈍光

5 表面：平滑

色調：不透明、淡い黄色

(2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

生育：中程度

形状：放散状

10 (3) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

液化する。

C 生理学的性質

(1) VP試験：陰性

(2) インドールの生成：陰性

15 (3) 硝酸からのガス生成：陽性

(4) 澱粉の加水分解：陽性

(5) 色素の生成：可溶性色素の生成はない

(6) ウレアーゼ：陽性

(7) オキシダーゼ：陽性

20 (8) カタラーゼ：陽性

(9) 生育の範囲：pH 5.7乃至9.0、温度10乃至35℃

(10) 酸素に対する態度：好気性

(11) 炭素源の利用性と酸生成の有無

		利用性	酸生成
25	D-グルコース	利用する	陽性
	グリセロール	利用する	陽性

スクロース 利用する 陽性

ラクトース 利用する 陽性

(12) DNAのGC含量: 40%

- 5 バチルス グロビスポルス C11 (FERM BP-7144) 又は
バチルス グロビスポルス N75 (FERM BP-7591) の培養
物から得ることができる α -イソマルトシル転移酵素を、本発明者等が
カラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組み合わせて単
離し、その性質・性状を調べたところ、非還元末端の結合様式として α -
10 -1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として
 α -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質か
ら、 α -イソマルトシル転移することによって、サイクロ ($\rightarrow 6$) - α -
-D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1
- \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラ
15 ノシル-(1 \rightarrow) の構造を有する糖質を生成する酵素活性を有し、かつ、
配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列を有するポリペプ
チドであることが判明した。更に、当該ポリペプチドの理化学的性質は
次のとおりであった。

(1) 分子量

- 20 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、約 82,000
乃至 132,000 ダルトン

(2) 至適温度

pH 6.0、30 分間反応で、約 50 °C

(3) 至適 pH

- 25 35 °C、30 分間反応で、pH 約 5.5 乃至 6.0

(4) 温度安定性

pH 6.0、60分間保持で、約45℃以下に温度安定域を有する。

(5) pH安定性

4℃、24時間保持で、pH約4.5乃至10.0の範囲内にpH安定域を有する。

- 5 次に、本発明に係る α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの理化学的性質を解明すべく行った実験について説明する。

実験1 バチルス グロビスポルスC11由来のポリペプチドの調製

実験1-1 粗ポリペプチドの調製

- 10 澱粉部分分解物『バインデックス#4』4.0w/v%、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8w/v%、リン酸ニカリウム0.1w/v%、リン酸ナトリウム・12水塩0.06w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05w/v%、および水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20
- 15 分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルスC11(FERM B P-7144)を接種し、27℃、230rpmで48時間回転振盪培養したものゝ種培養とした。これとは別に、容量30Lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約20L入れて、加熱滅菌、冷却して温度27℃とした後、前記種培養液1v/v%を接種し、温度27℃、
- 20 pH6.0乃至8.0に保ちつつ、48時間通気攪拌培養した。培養後、培養物中の酵素活性を測定したところ、 α -イソマルトシル転移酵素活性は約1.8単位/mlで、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約0.55単位/mlであった。この培養物を遠心分離(10,000rpm、30分間)して回収した上清約18Lの酵素活性を測定し
- 25 たところ、 α -イソマルトシル転移酵素活性は約1.7単位/ml(総活性約30,400単位)で、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素

活性は約 0.51 単位 / ml (総活性約 9,180 単位)であり、両酵素活性とも主に培養上清中に検出され、両酵素とも培養液に分泌される分泌型ポリペプチドであることが判明した。

なお、 α -イソマルトシル転移酵素活性の測定は、パノースを濃度 2 w / v % となるよう 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解させて
5 基質液とし、この基質液 0.5 ml に酵素液 0.5 ml 加えて、35℃
で 30 分間酵素反応し、その反応液を 10 分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液中のグルコース量をグルコースオキシダーゼ法で定量し、 α -イソマルトシル転移酵素の活性 1 単位を上記条件下で 1 分間に
10 1 μ モルのグルコースを生成する酵素量と定義した。

また、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性の測定は、マルトリオースを濃度 2 w / v % となるよう 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解させ基質液とし、その基質液 0.5 ml に酵素液 0.5 ml 加えて、35℃で 60 分間酵素反応し、その反応液を 10 分間煮沸して
15 反応を停止させた後、その反応液中のマルトース量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量し、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性 1 単位を上記の条件下で 1 分間に 1 μ モルのマルトースを生成する酵素量とした。なお、HPLC は、『ショーデックス (Shodex) KS-801 カラム』(昭和電気株式会社製)を用い、カラム温度 6
20 0℃、溶離液として水を用い、流速 0.5 ml / min の条件で行い、検出は示差屈折計『RI-8012』(東ソー株式会社製)を用いて行なった。

上記した培養上清約 18 L を 80% 飽和硫酸アンモニウムで塩析して、4℃で 24 時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離 (10,000 rpm、
25 30 分間) して回収し、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約 416 ml を得た。この粗酵素液

は、 α -イソマルトシル転移酵素活性を約 28,000 単位、6-グル
コシル酵素活性を約 8,440 単位を含むことが判明した。この粗酵素
液を、三菱化学製『セパビーズ (Sepabeads) FP-DA13』
ゲルを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。 α -イソ
5 マルトシル転移酵素活性、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性
は、いずれも、『セパビーズ (Sepabeads) FP-DA13』ゲ
ルに吸着せずに、非吸着画分に検出された。この非吸着画分を回収し、
1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、
その透析液を遠心分離して不溶物を除き、アマシャム・ファルマシア・
10 バイオテック株式会社製『セファクリル (Sephacryl) HR S-
200』ゲルを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー (ゲル
量 500 ml) に供した。酵素活性は、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルに吸着し、硫酸濃度が 1 M から 0 M に減少
するリニアグラジエント、更に続いて、マルトテトラオース濃度が 0 m
15 M から 100 mM に上昇するリニアグラジエントで溶出させたところ、
 α -イソマルトシル転移酵素活性と α -イソマルトシルグルコ糖質生成
酵素活性は分離してカラムから溶出し、 α -イソマルトシル転移酵素活
性は、硫酸のリニアグラジエントでその濃度が約 0 M 付近の画分に検出
され、一方、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルトテ
20 トラオースのリニアグラジエントでその濃度が約 30 mM 付近の画分に
検出された。次いで、 α -イソマルトシル転移酵素活性画分と α -イソ
マルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分とを別々に集め、それぞれ、 α -
イソマルトシル転移酵素活性を有する粗ポリペプチド、 α -イソマル
トシルグルコ糖質生成酵素活性を有する粗ポリペプチドとして回収した。
25 更に、以下の手法により、 α -イソマルトシル転移酵素活性を有する
ポリペプチドと、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する

ポリペプチドとを別々に精製し、分取した。

実験 1-2 α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの精製

- 5 実験 1-1 で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する粗ポリペプチドを、1 M 硫安を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール (Butyl-ToyopEARL) 650 M』ゲルを用いた疎水性カラムクロマトグラフィー (ゲル量 350 ml) に供した。
- 10 本酵素活性は、『ブチルートヨパール (Butyl-ToyopEARL) 650 M』ゲルに吸着し、硫安濃度が 1 M から 0 M に減少するリニアグラジエントで溶出させたところ、硫安濃度約 0.3 M 付近で吸着した酵素活性が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を 1 M 硫安を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析
- 15 し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200 ゲル』を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。この各精製ステップにおける α -イソマルトシル転移酵素活性量、比活性、収率を表 1 に示す。

表 1

工 程	α -イソマルト シル転移酵素活 性量(単位)	α -イソマルトシル 転移酵素の比活性 (単位/mg蛋白質)	収 率 (%)
培 養 上 清	30,400	0.45	100
硫酸塩析後の透析液	28,000	1.98	92.1
イオン交換樹脂カラムクロマト グラフィー溶出液	21,800	8.56	71.7
アフィニティーカラムクロマト グラフィー溶出液	13,700	21.9	45.1
疎水性カラムクロマトグラフィー 溶出液	10,300	23.4	33.9
アフィニティーカラムクロマト グラフィー溶出液	5,510	29.6	18.1

α -イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを、7.5% (w/v) 濃度のポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動にかけてその純度を検定したところ、単一の蛋白質バンドを示す純度の高い標品であった。

実験 1-3 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製

実験 1-1 で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する粗ポリペプチドを、1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール (Butyl-ToyopEARL) 650 M』ゲルを用いた疎水性カラムクロマトグラフィー (ゲル量 350 ml) に供した。本酵素活性は、『ブチルートヨパール (Butyl-ToyopEARL) 650 M』ゲルに吸着し、硫酸濃度が 1 M から 0

Mに減少するリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3 M付近でゲルに吸着した酵素活性成分が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル（Sephacryl）HR S-200ゲル』を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。この各精製ステップにおける α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量、比活性、収率を表2に示す。

表 2

工 程	α -イソマルト シルグルコ糖質 生成酵素活性量 (単位)	α -イソマルトシル グルコ糖質生成酵素 の比活性 (単位/mg蛋白質)	収 率 (%)
培 養 上 清	9, 180	0.14	100
硫酸塩析後の透析液	8, 440	0.60	91.9
イオン交換樹脂カラムクロマト グラフィー溶出液	6, 620	1.08	72.1
アフィニティーカラムクロマト グラフィー溶出液	4, 130	8.83	45.0
疎水性カラムクロマトグラフィー 溶出液	3, 310	11.0	36.1
アフィニティーカラムクロマト グラフィー溶出液	2, 000	13.4	21.8

10

精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を、7.5%（w/v）濃度のポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動にかけてその純度を検定したところ、単一の蛋白質バンドを示す純度の高い標品であった。

実験 2 α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの理化学的性質

実験 2-1 作用

5 基質として、グルコース、6-O- α -グルコシルグルコース（別名、イソマルトース）、6²-O- α -グルコシルマルトース（別名、パノース）、6³-O- α -グルコシルマルトトリオース（別名、イソマルトシルマルトース）、6⁴-O- α -グルコシルマルトテトラオース、または
10 6⁵-O- α -グルコシルマルトペンタオースを 10 mM 含む水溶液を調製し、これに実験 1-2 で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを基質 1 mM 当り 2 単位加え、30℃、pH 6.0 で 12 時間反応させた。反応物を常法により脱塩後、三菱化学製 HPLC 用カラム『MC1 GEL CK04SS』を用いる HPLC により糖組成を分析した。HPLC は温度 80℃ で実施し、溶出液を東ソー
15 製示差屈折計『RI-8012 型』でモニターしながら、溶離液として水を 0.4 ml / 分の流速でカラムに通液した。結果を表 3 に示す。

表 3

基 質	反応物中の糖質	組成(%)
グルコース	グルコース	100
6-O- α -グルコシルグルコース	6-O- α -グルコシルグルコース	100
6 ² -O- α -グルコシルマルトース	グルコース	32.2
	イソマルトース	2.1
	6 ² -O- α -グルコシルマルトース	4.6
	環状四糖	43.5
	イソマルトシルパノース	4.8
	イソマルトシルパノシド	1.8
	その他	11.0
6 ³ -O- α -グルコシルマルトトリオース	マルトース	50.6
	イソマルトース	2.0
	6 ³ -O- α -グルコシルマルトトリオース	4.2
	環状四糖	30.8
	その他	12.4
6 ⁴ -O- α -グルコシルマルトテトラオース	イソマルトース	1.9
	マルトトリオース	60.7
	環状四糖	25.6
	6 ⁴ -O- α -グルコシルマルトテトラオース	3.4
	その他	8.4
6 ⁵ -O- α -グルコシルマルトペンタオース	イソマルトース	1.6
	マルトテトラオース	66.5
	環状四糖	18.2
	6 ⁵ -O- α -グルコシルマルトペンタオース	4.3
	その他	9.4

表 3 中、イソマルトシルパノースは、構造式 1 又は 2 の構造を有する糖質（2 種類の糖質）、およびイソマルトシルパノシドは、構造式 3 の構

トリオースからは30.8%、 $6^4-O-\alpha$ -グルコシルマルトテトラオースからは25.6%、 $6^5-O-\alpha$ -グルコシルマルトペンタオースからは18.2%であった。なお、グルコースおよび $6-O-\alpha$ -グルコシルグルコースからは新たな糖質の生成を見なかった。

5

実験2-2 N末端側アミノ酸配列

常法により、パーキン・エルマー製気相プロテイン・シーケンサー『473A型』を使用して分析したところ、 α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドは、N末端側に配列表における配列番号5に示すアミノ酸配列を有していた。

10

実験2-3 部分アミノ酸配列

実験1-2で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを適量とり、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)に対して4℃で18時間透析後、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH9.0)を加えて酵素濃度を約1mg/mlとした。この溶液を約1mlとり、リジルエンドペプチダーゼ(和光純薬株式会社販売)を10 μ g加え、30℃、22時間インキュベートして酵素を部分加水分解した。加水分解物を、予め8%(v/v)水性アセトニトリルを含む0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸で平衡化させておいた液体クロマトグラフィー用カラム『マイクロボンドバックC18カラム』(直径2.1mm×長さ150mm、ウォーターズ社製)に負荷し、流速0.9ml/分、室温で0.1%トリフルオロ酢酸-8%アセトニトリル溶液から0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸-40%アセトニトリル溶液に120分間かけて変化するリニアグラジエントを通液し、カラムから溶出したペプチド断片を波長210nmの吸光度を測定することにより検出した。通液開

15

20

25

始から約 22 分後、約 38 分後、約 40 分後、約 63 分後および約 71 分後に溶出したペプチド断片を含む画分をそれぞれ採取し、真空乾燥後、50% (v/v) 水性アセトニトリルを含む 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸にそれぞれ溶解した。以降、実験 2-2 と同様に分析したところ、5 種類のペプチド断片が得られ、それらペプチド断片は、配列表における配列番号 6 乃至 10 に示すアミノ酸配列を有していた。

実験 2-4 分子量

ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第 227 巻、680 乃至 685 頁 (1970 年) に報告している方法に準じて、実験 1-2 で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、分子量約 82,000 乃至 122,000 ダルトンに相当する位置に、当該酵素活性を有する単一の蛋白質バンドが観察された。なお、このときの分子量マーカーは、ミオシン (200,000 ダルトン)、 β -ガラクトシダーゼ (116,250 ダルトン)、フォスフォリラーゼ B (97,400 ダルトン)、血清アルブミン (66,200 ダルトン) およびオボアルブミン (45,000 ダルトン) であった。

20 実験 2-5 至適温度

実験 1-2 で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを、常法により、20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中、異なる温度で 30 分間反応させたところ、第 1 図に示すように、当該ポリペプチドは、約 50°C に至適温度を示した。

25

実験 2-6 至適 pH

実験 1 - 2 で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを、常法により、pH の相違するマッキルヴェイン氏緩衝液中、35℃で30分間反応させたところ、第2図に示すように、当該ポリペプチドは、pH 約 5.5 乃至 6.0 に至適 pH を示した。

5

実験 2 - 7 熱安定性

実験 1 - 2 で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを、常法により、20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中、異なる温度で60分間インキュベートしたところ、当該ポリペプチドは、第3図に示すように、約 40℃以下に温度安定域を有していた。

10

実験 2 - 8 pH 安定性

実験 1 - 2 で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを、常法により、pH の異なるマッキルヴェイン氏緩衝液または 50 mM 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液中、4℃で24時間インキュベートしたところ、当該ポリペプチドは、第4図に示すように、pH 約 4.5 乃至 9.0 の範囲に pH 安定域を有していた。

15

実験 3 バチルス グロビスポルス N75 由来のポリペプチド

20 実験 3 - 1 粗ポリペプチドの調製

澱粉部分分解物『バインデックス #4』4.0 w/v %、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8 w/v %、リン酸ニカリウム 0.1 w/v %、リン酸一ナトリウム・12水塩 0.06 w/v %、硫酸マグネシウム・7水塩 0.05 w/v % 及び水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに 100 ml ずつ入れ、オートクレーブで 121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス N75 (FERM BP

25

ー 7 5 9 1) を接種し、27℃、230rpmで48時間回転振盪培養したものを種培養液とした。

容量30Lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約20L入れて、加熱滅菌、冷却して27℃とした後、種培養液1v/v%を
5 接種し、27℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、48時間通気攪拌培養した。培養後の培養液中の本酵素活性は約1.1単位/mlであり、遠心分離(10,000rpm、30分間)して回収した上清約18Lの本酵素活性は1.1単位/ml(総酵素活性約19,800単位)で、
α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は約0.33単位/mlの活性
10 (総活性約5,490単位)であり、両酵素活性共に培養上清中に検出される分泌型ポリペプチドであることが判明した。

上記した培養上清約18Lを60%飽和硫酸液で塩析して4℃で24時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離(10,000rpm、30分間)して回収し、10mMトリス・塩酸緩衝液(pH8.3)に溶
15 解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約450mlを得た。この粗酵素液は、α-イソマルトシル転移酵素活性を約15,700単位、α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を約4,710単位有していた。この粗酵素液を、実験1-1に記載の『セパビーズ(Sepabeads)FP-DA13』ゲル(三菱化学株式会社製)を用いたイオン
20 交換カラムクロマトグラフィーに供した。α-イソマルトシル転移酵素活性画分は、セパビーズ(Sepabeads)FP-DA13ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出し、α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、セパビーズ(Sepabeads)FP-DA13ゲルに吸着した。続いて、NaCl濃度0Mから1Mに上昇するリニアグラジエ
25 トで溶出させたところ、α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分は、NaClのリニアグラジエント濃度が約0.25M付近で溶出し

た。そこで、 α -イソマルトシル転移酵素活性画分と、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分とを別々に集め、それぞれ、 α -イソマルトシル転移酵素活性を有する粗ポリペプチド、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する粗ポリペプチドを得た。

- 5 更に、以下の精製方法により、 α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドと、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドとを別々に精製し、分取した。

10 実験 3-2 α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの精製

- 実験 3-1 で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する粗ポリペプチドを、1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除去し、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲル (アマシャム・ファルマシア・バイオテク株式会社製) を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー (ゲル量 500 ml) に供した。本ポリペプチドは、セファクリル HR S-200 ゲルに吸着し、硫酸濃度 1 M から 0 M に減少するリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0.3 M 付近でゲルに吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収した。更に、本酵素活性画分を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブチルートヨパール (Butyl-Toyopearl) 650 M』ゲル (東ソー株式会社製) を用いた疎水カラムクロマトグラフィー (ゲル量 350 ml) に供した。本ポリペプチドは、ブチルートヨパール 650 M ゲルに吸着し、硫酸濃度 1 M から 0 M に減少するリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0.3 M 付近で吸着した酵素が溶出し、

本酵素活性を示す画分を回収した。この回収液を10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『スーパーQートヨパール (Super Q-Toyoparl 650C)』ゲル (東ソー株式会社製) を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィ (ゲル量 380 ml) に供した。本ポリペプチドは、スーパーQートヨパール (Super Q-Toyoparl 650C) ゲルに吸着せずに非吸着画分に溶出した。この溶出画分を回収し、 α -イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを得た。これら各精製ステップに於ける α -イソマルトシル転移酵素活性量、比活性、収率を表 4 に示す。

表 4

工 程	α -イソマルトシル 転移酵素活性量 (単位)	α -イソマルトシル 転移酵素の比活性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
培養上清	19,000	0.33	100
硫酸塩析後の透析液	15,700	0.64	82.6
イオン交換カラム溶出液	12,400	3.56	65.3
アフィニティーカラム溶出液	8,320	11.7	43.8
疎水カラム溶出液	4,830	15.2	25.4
イオン交換カラム溶出液	3,850	22.6	20.3

7.5 w/v % 濃度 ポリアクリルアミドを含む SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により、本実験で最終的に得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で、純度の高い標品であった。

実験 3-3 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製

実験 3-1 で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有す

る粗ポリペプチドを1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル(Sephacryl) HR S-200』ゲル(アマシャム・ファルマシア・バイオテク株式会社製)を用いたアフィニティークロマトグラフィー(ゲル量500 ml)に供した。本酵素活性成分は、セファクリル(Sephacryl) HR S-200ゲルに吸着し、硫酸濃度1 Mから0 Mに減少するリニアグラジエント、続いて、マルトテトラオース濃度0 mMから100 mMに上昇するリニアグラジエントで溶出させたところ、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性成分は、リニアグラジエントのマルトテトラオース濃度が約30 mM付近で吸着していたゲルから溶出し、本酵素活性を示す画分を回収した。この回収液を1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoppearl) 650 M』ゲル(東ソー株式会社製)を用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350 ml)に供した。本酵素は、ブチルートヨパール(Butyl-Toyoppearl) 650 Mゲルに吸着し、硫酸濃度1 Mから0 Mに減少するリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3 M付近でゲルに吸着した本酵素活性成分が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収した。この回収液を1 M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、セファクリル(Sephacryl) HR S-200ゲルを用いるアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。これら各精製ステップにおける α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量、比活性、収率を表5に示す。

工 程	α -イソマルト シルグルコ糖質 生成酵素活性量 (単位)	α -イソマルト シルグルコ糖質 生成酵素比活性 (単位/mg蛋白質)	収 率 (%)
培養上清	5, 940	0.10	100
硫酸塩析後の透析液	4, 710	0.19	79.3
イオン交換カラム 溶出液	3, 200	2.12	53.9
アフィニティーカラム 溶出液	2, 210	7.55	37.2
疎水カラム溶出液	1, 720	10.1	29.0
アフィニティーカラム 溶出液	1, 320	12.5	22.2

得られた精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を7.5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により本酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

5

実験4 α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの理化学的性質

実験4-1 作用

基質として、グルコース、6-O- α -グルコシルグルコース（別名、イソマルトース）、6²-O- α -グルコシルマルトース（別名、パノース）、6³-O- α -グルコシルマルトトリオース（別名、イソマルトシルマルトース）、6⁴-O- α -グルコシルマルトテトラオース、又は6⁵-O- α -グルコシルマルトペンタオースを10mM含む水溶液を調製し、これに実験3-2で調製した α -イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを基質1mM当たり2単位加え、30℃、pH6.0で12時間反応させた。反応物を常法により脱塩した後、実験2-1に記載したHPLC法により糖組成を分析した。その結果を表6に示す。

表 6

基 質	反 応 物 中 の 糖 質	組 成 (%)
グルコース	グルコース	100
6-O- α -グルコシルグルコース	6-O- α -グルコシルグルコース	100
6 ² -O- α -グルコシルグルコース	グルコース	31.8
	イソマルトース	2.0
	6 ² -O- α -グルコシルグルコース	4.4
	環状四糖	43.2
	イソマルトシルパノース	6.5
	イソマルトシルパノシド	2.4
	その他	9.7
6 ³ -O- α -グルコシルグルコース	マルトース	50.3
	イソマルトース	1.9
	6 ³ -O- α -グルコシルグルコース	4.5
	環状四糖	30.9
	その他	12.4
6 ⁴ -O- α -グルコシルグルコース	イソマルトース	1.5
	マルトトリオース	60.9
	環状四糖	25.8
	6 ⁴ -O- α -グルコシルグルコース	3.2
	その他	8.6
6 ⁵ -O- α -グルコシルグルコース	イソマルトース	1.4
	マルトテトラオース	66.6
	環状四糖	18.7
	6 ⁵ -O- α -グルコシルグルコース	4.2
	その他	9.1

表 6 の結果は、バチルス グロビスポルス N 7 5 由来の α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドが、非還元末端の結合様式と

して $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度3以上の糖質である $6^2-O-\alpha$ -グルコシルマルトース、 $6^3-O-\alpha$ -グルコシルマルトトリオース、 $6^4-O-\alpha$ -グルコシルマルトテトラオース、
5 及び $6^5-O-\alpha$ -グルコシルマルトペンタオースに作用して、主として、環状四糖と、用いた基質よりもグルコース重合度が2低下したマルトオリゴ糖を生成したことを示している。反応物からは、これら環状四糖と、基質よりもグルコース重合度が2低下したマルトオリゴ糖未反応の基質に代えて、加水分解作用に由来すると考えられる微量のイソマル
10 トースと、転移作用に由来すると考えられる環状四糖以外のその他の糖質が検出された。基質としての $6^2-O-\alpha$ -グルコシルマルトース、 $6^3-O-\alpha$ -グルコシルマルトトリオース、 $6^4-O-\alpha$ -グルコシルマルトテトラオース、及び $6^5-O-\alpha$ -グルコシルマルトペンタオースを用いたときの環状四糖の生成収率は、固形物当たり、それぞれ4
15 3.2%、30.9、25.8%及び18.7%であった。 $6-O-\alpha$ -グルコシルグルコースからは、新たな糖質の生成を認めなかった。

実験4-2 N末端側アミノ酸配列

常法により、実験3-2で調製した α -イソマルトシル転移酵素活性
20 を有する精製ポリペプチドのN末端側アミノ酸配列を『プロテインシーケンサー モデル473A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号5に示すアミノ酸配列を有していた。

25 実験4-3 部分アミノ酸配列

実験3-2で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリ

ペプチドを適量とり、10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して4℃で透析した後、同緩衝液を用いて約1 mg/mlの濃度になるように希釈した。この希釈液約1 mlにリジルエンドペプチダーゼ (和光純薬株式会社販売) 10 μgを加え、30℃で22時間反応させて精製ポリペプチドを部分加水分解した。得られた部分加水分解物を、予め4% (v/v) 水性アセトニトリルを含む0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸で平衡化させておいた液体クロマトグラフィー用カラム『マイクロボンドスフェアーC18カラム』(直径3.9 mm×長さ150 mm、ウォーターズ社製) に負荷し、流速0.9 ml/分、室温で0.1%トリフルオロ酢酸-4%アセトニトリル溶液から0.1%トリフルオロ酢酸-42.4%アセトニトリル溶液に90分間かけて変化するリニアグラジエントを通液し、カラムから溶出したペプチド断片を波長210 nmの吸光度を測定することにより検出した。通液開始から、約21分後、約38分後、約56分後及び約69分後に溶出したペプチド断片を含む画分をそれぞれ採取し、各々真空乾燥した後、50% (v/v) 水性アセトニトリルを含む0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸にそれぞれ溶解した。以降、実験2-2と同様に分析したところ、配列表における配列番号8及び11乃至14に示すアミノ酸配列を有する5種類のペプチド断片が得られた。

20

実験4-4 分子量

実験3-2で得たα-イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを、実験2-4と同様にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (ゲル濃度7.5 w/v%) に供し、同時に泳動した分子量マーカー (日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製) と比較して当該ポリペプチドの分子量を測定したところ、分子量約92,000乃至

25

1 3 2 0, 0 0 0 ダルトンに相当する位置に、当該酵素活性を有する単一の蛋白質バンドが検出された。

実験 4 - 5 至適温度

- 5 実験 1 - 1 に示す α - イソマルトシル転移酵素の活性測定方法に準じて、実験 3 - 2 で得た α - イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを 2 0 m M 酢酸緩衝液 (p H 6 . 0) 中で、各種温度で 3 0 分間反応させたところ、第 5 図に示すように、当該ポリペプチドの至適温度は約 5 0 °C であった。

10

実験 4 - 6 至適 p H

- 実験 1 - 1 に示す α - イソマルトシル転移酵素の活性測定方法に準じて、実験 3 - 2 で得た α - イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを各種 p H のマッキルヴェイン氏緩衝液中で、3 5 °C で 3 0 分間反応させたところ、第 6 図に示すように、当該ポリペプチドの至適 p H は p H 約 6 . 0 であった。

15

実験 4 - 7 熱安定性

- 20 実験 1 - 1 に示す α - イソマルトシル転移酵素の活性測定方法に準じて、実験 3 - 2 で得た α - イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを 2 0 m M 酢酸緩衝液 (p H 6 . 0) 中で、各種温度で 6 0 分間反応させたところ、当該ポリペプチドは、第 7 図に示すように、約 4 5 °C 以下に温度安定域を有していた。

25 実験 4 - 8 p H 安定性

実験 1 - 1 に示す α - イソマルトシル転移酵素の活性測定方法に準じ

て、実験 3-2 で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する精製ポリペプチドを各種 pH のマッキルヴェイン氏緩衝液又は 50 mM 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液中で、4 °C で 24 時間反応させたところ、第 8 図に示すように、 α -イソマルトシル転移酵素を有する精製ポリペプチドの pH 安定域は、pH 約 4.5 乃至 10.0 の範囲であった。

実験 5 バチルス グロビスポルス C11 由来のポリペプチドをコードする DNA を含む組換え DNA と形質転換体

10 実験 5-1 染色体 DNA の調製

澱粉部分分解物『パインデックス #4』2.0 w/v %、酵母抽出物『アサヒミースト』1.0 w/v %、リン酸ニカリウム 0.1 w/v %、リン酸ナトリウム・12 水塩 0.06 w/v %、硫酸マグネシウム・7 水塩 0.05 w/v % および水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに 100 ml ずつ入れ、オートクレーブで 121 °C、20 分間滅菌し、冷却して、バチルス・グロビスポルス C11 (FERM B-7144) を接種し、27 °C、230 rpm で 24 時間回転振盪培養した。遠心分離により培養物から採取した菌体を TES 緩衝液 (pH 8.0) に浮遊させ、リゾチームを 0.05 % (w/v) 加え、37 °C で 30 分間インキュベートした。処理物を -80 °C で 1 時間凍結後、TSS 緩衝液 (pH 9.0) を加えて 60 °C に加温し、TES 緩衝液/フェノール混液を加え、氷水中で冷却しながら 5 分間激しく振盪した後、遠心分離により上清を採取した。この上清に 2 倍容の冷エタノールを加え、沈殿した粗染色体 DNA を採取し、SSC 緩衝液 (pH 7.1) に溶解後、リボヌクレアーゼとプロテイナーゼをそれぞれ 7.5 μ g および 125 μ g 加え、37 °C で 1 時間インキュベートして反応させた。反

応物にクロロホルム／イソアミルアルコール混液を加えて染色体DNAを抽出し、冷エタノールを加え、生成した染色体DNAを含む沈殿を採取した。このようにして得た精製染色体DNAを濃度約1 mg / mlとなるようにSSC緩衝液(pH 7.1)に溶解し、得られた溶液を-80℃で凍結した。

実験5-2 組換えDNA pBGC1と形質転換体BGC1の調製

実験5-1で調製した精製染色体DNA溶液を1 mlとり、これに制限酵素Sau 3A Iを約35単位加え、37℃で20分間反応させて染色体DNAを部分分解した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約2,000乃至6,000塩基対からなるDNA断片を採取した。別途、ストラタジーン・クローニング・システム製プラスミドベクター『Blue script II SK(+)]』を常法により制限酵素Bam HIを作用させて完全に切断した後、その切断されたプラスミドベクター0.5 μgと先に得たDNA断片約5 μgとを宝酒造製『DNAライゲーション・キット』を用いて、添付の説明書にしたがって操作して連結し、得られた組換えDNAを用いて、通常のコピテントセル法によりストラタジーン・クローニング・システム製コピテントセル『Episcurian Coli XL2-Blue』100 μlを形質転換して遺伝子ライブラリーを作製した。このようにして得た遺伝子ライブラリーとしての形質転換体を、常法により調製した、トリプトン10 g / L、酵母エキス5 g / L、塩化ナトリウム5 g / L、アンピシリンナトリウム塩100 mg / Lおよび5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシド50 mg / Lを含む寒天平板培地(pH 7.0)に植菌し、37℃で24時間培養後、培地上に形成された白色のコロニー約5,000個をアマシャム製ナイロン膜『Hybond-N+』上に固定し

た。別途、実験 2 - 3 の方法で明らかにした、配列表における配列番号 8 に示すアミノ酸配列における第 1 番目より第 6 番目までのアミノ酸配列に基づき 5' - A A Y T G G T G G A T G W S N A A - 3' で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、常法にしたがい [γ - ³²P] A T P および T 4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて同位体標識して、合成 DNA (プローブ 1) を得た。次いで、先に得たナイロン膜上に固定したコロニーのうち、プローブ 1 と顕著な会合を示すコロニーを、通常のコロニーハイブリダイゼーション法を適用して 4 種類の形質転換体を選択した。常法により、これら 4 種類の形質転換体から組換え DNA を採取する一方、配列表における配列番号 7 に示すアミノ酸配列における第 9 番目より第 14 番目までのアミノ酸配列に基づき、5' - G T N T T Y A A Y C A R T A Y A A - 3' で表わされる塩基配列のプローブ 2 を化学合成し、同様に同位体標識した後、通常のリザードン・ハイブリダイズ法を適応して、顕著な会合を示した組換え DNA を選択し、選択した形質転換体を『B G C 1』と命名した。この形質転換体 B G C 1 を常法にしたがい、アンピシリンナトリウム塩 100 μg / ml を含む LB 培地 (pH 7.0) に植菌し、37℃で 24 時間回転培養し、培養終了後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、通常のアリカリ SDS 法により組換え DNA を抽出した。この組換え DNA の塩基配列を、通常のリザードン法により分析したところ、当該組換え DNA は、バチルス グロビスポルス C 11 (FERM B P - 7 144) に由来する、鎖長 3869 塩基対の、配列表における配列番号 15 に示す塩基配列の DNA を含んでいた。当該組換え DNA において、前記配列表における配列番号 15 に示す塩基配列からなる DNA は、第 9 図中、黒い太線で示す部分で表され、制限酵素 Xba I による認識部位の下流に連結されていた。

一方、この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、その配列番号 1
5 に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と、実験 2-2 の方法で
確認された α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの N
末端側のアミノ酸配列および実験 2-3 の方法で明らかにされた中間部
5 部分アミノ酸配列である、配列表における配列番号 5 および配列番号 6
乃至 10 に示すアミノ酸配列と比較したところ、配列表における配列番
号 5 に示すアミノ酸配列は、配列番号 15 に併記したアミノ酸配列にお
ける第 30 番目から第 48 番目のアミノ酸配列と完全に一致した。また、
配列表における配列番号 6、7、8、9 および 10 に示すアミノ酸配列
10 は、それぞれ、配列表における配列番号 15 に併記したアミノ酸配列に
おける第 584 乃至 597 番目、第 292 乃至 305 番目、第 545 乃
至 550 番目、第 66 乃至 77 番目および第 390 乃至 400 番目のア
ミノ酸配列と完全に一致した。以上のことは、 α -イソマルトシル転移
酵素活性を有するポリペプチドが配列表における配列番号 1 に示すアミ
15 ノ酸配列を含むものであり、当該ポリペプチドはバチルス グロビスポ
ルス C11 (FERM BP-7144) においては、配列表における
配列番号 3 に示す塩基配列の DNA によりコードされていることを示し
ている。また、配列表における配列番号 15 に併記したアミノ酸配列に
おける第 1 乃至 29 番目のアミノ酸配列は、当該ポリペプチドの分泌シ
20 グナル配列と推定された。これらのことから、当該ポリペプチドの分泌
前の前駆体ペプチドは、配列表における配列番号 15 に併記されたアミ
ノ酸配列からなり、そのアミノ酸配列は、配列表における配列番号 15
に示す塩基配列にコードされていることが判明した。以上のようにして
調製し、塩基配列を確認した組換え DNA を『pBGC1』と命名した。

するDNAを含む組換えDNAと形質転換体の調製

実験6-1 染色体DNAの調製

澱粉部分分解物『バインデックス#4』2.0% (w/v)、酵母抽出物『アサヒミースト』1.0% (w/v)、リン酸ニカリウム0.1% (w/v)、リン酸ナトリウム・12水塩0.06% (w/v)、硫酸マグネシウム・7水塩0.05% (w/v) 及び水からなる液体培地を500 ml 容三角フラスコに100 ml ずつ入れ、オートクレーブで121℃で20分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルスN75 (FERMBP-7591) を接種し、27℃で230 rpmで24時間回転振盪培養した。遠心分離により培養物から採取した菌体をTES緩衝液 (pH 8.0) に浮遊させ、リゾチームを0.05% (w/v) 加え、37℃で30分間インキュベートした。処理物を-80℃で1時間凍結後、TSS緩衝液 (pH 9.0) を加えて60℃に加温し、TES緩衝液/フェノール混液を加え、氷水中で冷却しながら5分間激しく振盪した後、遠心分離して上清を採取した。この上清に2倍容の冷エタノールを加え、沈殿した粗染色体DNAを採取し、SSC緩衝液 (pH 7.1) に溶解後、リボヌクレアーゼとプロテイナーゼをそれぞれ7.5 µg又は125 µg加え、37℃で1時間インキュベートして反応させた。反応物にクロロホルム/イソアミルアルコール混液を加えて染色体DNAを抽出し、冷エタノールを加え、生成した染色体DNAを含む沈殿を採取した。このようにして得た精製染色体DNAを濃度約1 mg/mlになるようにSSC緩衝液 (pH 7.1) に溶解し、溶液を-80℃で凍結した。

25 実験6-2 組換えDNA pBGN1と形質転換体BGN1の調製

実験6-1で調製した精製染色体DNA溶液を0.1 mlとり、これ

に制限酵素 *Sac* I を約 100 単位加え、37℃で6時間反応させて染色体 DNA を分解した後、アガロース電気泳動法により分離し、クオ
ンタム・バイオテクノロジー社製の DNA 精製用キット『ジーンクリー
ン II キット (GENECLEAN II KIT)』を用いて、本キ
5 トに添付された説明書に従って操作して、約 3,000 乃至 7,000
塩基対からなる DNA 断片を回収した。別途、ストラタジーン・クロ
ーニング・システム製プラスミドベクター『Bluescript II S
K (+)』を常法により制限酵素 *Sac* I 作用させて完全に切断した後、
その切断されたプラスミドベクター 0.5 μ g と先に得た DNA 断片約
10 5 μ g とを宝酒造製『DNA ライゲーション・キット』を用いて、本キ
ットに添付された説明書にしたがって操作して連結し、得られた組換え
DNA を用いて、通常のコンピテントセル法によりストラタジーン・ク
ローニング・システム製コンピテントセル『Epicurian Coli
XL2-Blue』100 μ l を形質転換して遺伝子ライブラリ
15 ーを作製した。このようにして得た遺伝子ライブラリーとしての形質転
換体を、常法により調製した、トリプトン 10 g/L、酵母エキス 5 g
/L、塩化ナトリウム 5 g/L、アンピシリンナトリウム塩 100 mg
/L、及び 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトシ
ド 50 mg/L を含む寒天平板培地 (pH 7.0) に植菌し、37℃で
20 24 時間培養後、培地上に形成された白色のコロニー約 4,000 個を
アマシャム製ナイロン膜『ハイボンド (Hybond) -N+』上に固
定した。別途、実験 2-3 の方法で明らかにした、配列表における配列
番号 8 に示すアミノ酸配列における第 1 番目より第 6 番目までのアミノ
酸配列に基づき 5' - A A Y T G G T G G A T G W S N A A - 3' で表
25 わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、常法にしたがい
[γ -32P] ATP 及び T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて同位

体標識して合成DNA（プローブ1）を得た。次いで、先に得たナイロン膜上に固定したコロニーの内、プローブ1と顕著な会合を示すコロニーを、通常のコロニーハイブリダイゼーション法を適応して2種類の形質転換体を選択した。常法により、これら2種類の形質転換体から組換えDNAを採取する一方、配列表における配列番号14に示すアミノ酸配列における第8番目から第15番目までのアミノ酸配列に基づき、5'-G A Y T G G A T H G A Y T T Y T G G T T Y G G-3'で表わされる塩基配列のプローブ2を化学合成し、同様に同位体標識後、通常のサザン・ロット・ハイブリダイゼーション法を適応して、顕著な会合を示した組換えDNAを選択し、当該形質転換体を『BGN1』と命名した。この形質転換体BGN1を常法にしたがい、アンピシリンナトリウム塩を100 μ g/ml含むL-プロス培地（pH7.0）に植菌し、37℃で24時間回転振盪培養し、培養終了後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、通常のアルカリ-SDS法により組換えDNAを抽出した。この組換えDNAの塩基配列を、通常のジデオキシ法により分析したところ、当該組換えDNAは、バチルス グロビスポルスN75（FERM BP-7591）に由来する、鎖長4986塩基対の、配列表における配列番号16に示す塩基配列からなるDNAを含んでいた。当該組換えDNAに於いて、前記配列表における配列番号16に示される塩基配列からなるDNAは、第10図中、黒い太線で表され、制限酵素Sac Iによる認識部位の下流に連結していた。

一方、この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、その配列番号16に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と、実験4-2の方法で確認された α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドのN末端側のアミノ酸配列及び実験4-3の方法で明らかにされた中間部分アミノ酸配列である、配列表における配列番号5、8、及び11乃至

1 4 に示すアミノ酸配列と比較したところ、配列表における配列番号 5
に示すアミノ酸配列は、配列番号 1 6 に併記したアミノ酸配列における
第 3 0 乃至 4 8 番目のアミノ酸配列と完全に一致した。また、配列表に
おける配列番号 8、1 1、1 2、1 3 及び 1 4 に示すアミノ酸配列は、
5 それぞれ、配列表における配列番号 1 6 に併記したアミノ酸配列におけ
る第 5 4 5 乃至 5 5 0 番目、第 5 6 5 乃至 5 8 2 番目、第 6 6 乃至 8 3
番目、第 3 9 0 乃至 4 0 6 番目及び第 7 9 0 乃至 8 0 9 番目のアミノ酸
配列と完全に一致した。以上のことは、 α -イソマルトシル転移酵素活
性を有するポリペプチドが配列表における配列番号 2 に示すアミノ酸配
10 列を含むものであり、当該ポリペプチドは、バチルス グロビスポルス
N 7 5 (FERM B P-7 5 9 1) においては、配列表における配列
番号 4 に示す塩基配列の DNA によりコードされていることを示してい
る。また、配列表における配列番号 1 6 に併記したアミノ酸配列におけ
る第 1 乃至 2 9 番目のアミノ酸配列は、当該ポリペプチドの分泌シグナ
15 ル配列と推定された。これらのことから、当該ポリペプチドの分泌前の
前駆体ペプチドは、配列表における配列番号 1 6 に併記されたアミノ酸
配列からなり、そのアミノ酸配列は、配列表における配列番号 1 6 に示
す塩基配列にコードされていることが判明した。以上のようにして調製
し、塩基配列を確認した組換え DNA を『p B G N 1』と命名した。

20

実験 7-1 形質転換体による α -イソマルトシル転移酵素活性を有す
るポリペプチドの産生

実験 7-2 形質転換体 B G C 1

澱粉部分物『バインデックス # 4』5 g / L、ポリペプトン 2 0 g /
25 L、酵母エキス 2 0 g / L およびリン酸一水素ナトリウム 1 g / L を含
む水溶液を 5 0 0 m l 容三角フラスコに 1 0 0 m l 入れ、オートクレー

ブで 121°C で 15 分間処理し、冷却し、無菌的に $\text{pH } 7.0$ に調製した後、アンピシリンナトリウム塩 10 mg を無菌的に添加して液体培地を調製した。この液体培地に実験 3-2 の方法で得た形質転換体 BGC 1 を接種し、 27°C で約 48 時間通気攪拌培養した。この培養物中の当該ポリペプチドの所在を調べるために、常法にしたがい、遠心分離して培養上清と菌体とを分離して回収し、更に、菌体については、超音波破碎法による細胞からの全抽出物と、浸透圧ショック法による細胞ペリプラズムからの抽出物とを別々に調製した。超音波破碎法は、菌体を 10 mM リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) に懸濁した後、その菌体懸濁液を氷水中で冷却しながら超音波ホモゲナイザー『モデル UH-600』(株式会社エスエムテ製) で細胞破碎することによって行い、その破碎物を細胞全抽出物とした。浸透圧ショック法は、菌体を 30 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 ($\text{pH } 7.3$) で洗浄した後、洗浄菌体をスクロース 200 g/L および 1 mM EDTA を含む 33 mM トリス-塩酸緩衝液 ($\text{pH } 7.3$) に懸濁し 27°C で 20 分間振盪し、続いて、遠心分離して菌体を回収し、その菌体を、予め約 4°C に冷却しておいた 0.5 mM 塩化マグネシウム水溶液に懸濁し、氷水中で 20 分間振盪して細胞ペリプラズムから抽出した。その後、遠心分離して、上清を回収し、その上清を細胞ペリプラズム抽出物とした。このようにして調製した培養上清、細胞全抽出物、細胞ペリプラズム抽出物について、それぞれの α -イソマルトシル転移酵素活性を測定し、それぞれの活性値を培養物 1 ml 当りに換算した。結果を表 7 に示す。

表 7

試 料	α -イソマルトシル転移酵素活性 (単位/ml-培養物)
培 養 上 清	0.0
細 胞 全 抽 出 物	3.4
細 胞 ペ リ プ ラ ズ ム 抽 出 物	3.0

表7の結果から明らかなように、大腸菌形質転換体BGC1は、本発明の α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドを細胞内に産生し、その大部分は細胞ペリプラズムに分泌されることが判明した。

- 5 なお、第一の対照として、大腸菌XL2-Blue株を、培地にアンピシリンを添加していないこと以外はすべて上述の形質転換体の場合と同一条件で、培養し、培養物から培養上清と菌体破砕物を調製した。第二の対照として、バチルス グロビスポルスC11 (FERM B-7144) を、アンピシリンを含有していないこと以外はすべて上述の
- 10 形質転換体の場合と同一条件で培養し、培養物から培養上清と菌体破砕物を調製した。第一の対照の培養上清、菌体破砕物とも当該酵素活性は全く認められなかった。第二の対照の培養上清および菌体破砕物には当該酵素活性がそれぞれ約1.2単位および約0.1単位含まれ、培養物
- 15 換体BGC1の培養物当たりの全酵素活性3.4単位と比較すると明らかに低レベルであった。

本実験で得た細胞ペリプラズム抽出物を、更に実験1に示した方法に準じて、塩析、透析し、『セパビーズ (Sepabeads) FP-DA 13ゲル』、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200ゲル』、『ブチルートヨパール (Butyl-Tyoppearl) 650Mゲル』を用いたカラムクロマトグラフィーに供して精製し、更にこの精製酵素ポリペプチドを実験2に示した方法に準じて分析した。その結果、

20

S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量は約 82,000 乃至 122,000 ダルトン、等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による等電点は約 5.1 乃至 6.1、 α -イソマルトシル転移酵素活性の至適温度は約 50℃、至適 pH は約 5.5 乃至 6.0、温度安定性は約 45℃ まで、pH 安定性は約 4.5 乃至 9.0 であり、実験 1 に示した方法で調製された α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの理化学的性質と実質的に同一であった。以上の結果は、本発明の α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドが、組換え DNA 技術によって大量、安価かつ安定に製造できることを示している。

実験 7-2 形質転換体 BGN1

澱粉部分物『バインデックス #4』5 g/L、ポリペプトン 20 g/L、酵母エキス 20 g/L 及びリン酸一水素ナトリウム 1 g/L を含む水溶液を 500 ml 容三角フラスコに 100 ml 入れ、オートクレーブで 121℃ で 15 分間処理し、冷却し、無菌的に pH 7.0 に調製した後、アンピシリンナトリウム塩 10 mg を無菌的に添加して液体培地を調製した。この液体培地に実験 6-2 の方法で得た形質転換体 BGN1 を接種し、27℃ で約 48 時間通気攪拌培養した。この培養物中の当該ポリペプチドの所在を調べるために、常法にしたがい、遠心分離して培養上清と菌体とを分離して回収し、更に、実験 7-1 と同様に、超音波破碎法による細胞からの全抽出物と、浸透圧ショック法による細胞ペリプラズムからの抽出物とを別々に調製した。培養上清、細胞全抽出物、細胞ペリプラズム抽出物それぞれにつき、 α -イソマルトシル転移酵素活性を測定し、それらの活性値を培養物 1 ml 当りに換算した。結果を表 8 に示す。

表 8

試 料	α -イソマルトシル転移酵素活性 (単位/ml 培養物)
培 養 上 清	0. 2
細 胞 全 抽 出 物	3. 1
細胞ペリプラズム抽出物	2. 9

表 8 の結果から明らかなように、大腸菌形質転換体 B G N 1 は、本発明の α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドを細胞内に
 5 産生し、その大部分は細胞ペリプラズムに分泌されることが判明した。
 また、当該酵素活性は、培養上清にも認められた。

なお、第一の対照として、大腸菌 X L 2 - B l u e 株を、培地にアンピシリンを添加していないこと以外はすべて上述の形質転換体の場合と
 同一条件で、培養し、培養物から培養上清と菌体破砕物を調製した。第
 10 二の対照として、バチルス・グロビスポルス N 7 5 (F E R M B P -
 7 5 9 1) を、アンピシリンを含有していないこと以外はすべて上述の
 形質転換体の場合と同一条件で培養し、培養物から培養上清と菌体破砕物を調製した。第一の対照の培養上清、菌体破砕物とも当該酵素活性は
 全く認められなかった。第二の対照の培養上清および菌体破砕物には当
 15 該酵素活性がそれぞれ約 0. 7 単位および約 0. 1 単位含まれ、培養物
 当たりの全酵素活性は約 0. 8 単位であった。この酵素活性は、形質転
 換体 B G N 1 の培養物当たりの全酵素活性 3. 3 単位と比較すると明らか
 に低レベルであった。

本実験で得た細胞ペリプラズム抽出物を、更に実験 3 に示した方法に
 20 準じて、塩析、透析し、『セパビーズ (S e p a b e a d s) F P - D A
 1 3 ゲル』、『セファクリル (S e p h a c r y l) H R S - 2 0 0 ゲ

ル』、『ブチルートヨパール (Butyl-Tyopearl) 650M
ゲル』を用いたカラムクロマトグラフィーに供して精製し、更にこの精
製ポリペプチドを実験4の方法に準じて分析した。その結果、SDS-
ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量は約92,000乃至
5 132,000ダルトン、等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に
よる等電点は約7.3乃至8.3、 α -イソマルトシル転移酵素活性の
至適温度は約50℃、至適pHは約6.0、温度安定域は約45℃以下
で、pH安定域は約4.5乃至10.0の範囲であり、実験3の方法で
調製された α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの理
10 化学的性質と実質的に同一であった。以上の結果は、本発明のポリペ
プチドが、組換えDNA技術によって大量、安価かつ安定に製造できるこ
とを示している。

以上説明したように、非還元末端の結合様式として α -1,6グルコ
シル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1,4グル
15 コシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から環状四糖を生
成する酵素活性を有し、かつ、配列表における配列番号1又は2に示す
アミノ酸配列、若しくは、そのアミノ配列において、1若しくは複数個
のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリ
ペプチドは、本発明者の長年に亙る研究の一成果として見出されたもの
20 であり、従来公知の酵素には見られない独特の理化学的性質を具備して
いる。本発明は、組換えDNA技術を応用することにより、斯るポリペ
プチドを創製しようとするものである。以下、実施例等を参照しながら、
本発明のポリペプチド並びに製造方法および用途につき具体的に説明す
る。

25 本発明で言うポリペプチドとは、非還元末端の結合様式として α -1,
6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1,

4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から環状四糖を生成する酵素活性を有し、かつ、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列、若しくは、そのアミノ配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチド全般を意味する。本発明のポリペプチドは、通常、解明されたアミノ酸配列を有しており、その一例としては、例えば、配列表における配列番号1又は2に示すN末端からのアミノ酸配列またはそれに相同的なアミノ酸配列が挙げられる。配列番号1又は2に示すアミノ酸配列に相同的なアミノ酸配列を有する変異体は、所期の理化学的性質を5 実質的に変えることなく、配列番号1又は2のアミノ酸配列における構成アミノ酸の1若しくは複数個、即ち、1個または2個以上、場合によっては、1乃至50個、或いは、1乃至30個、若しくは、1乃至10個を欠損させたり、他のアミノ酸で置換したり、更には付加することにより得ることができる。なお、同じDNAであっても、それを導入する宿主や、そのDNAを含む形質転換体の培養に使用する栄養培地成分、組成や培養温度、pHなどによっては、宿主内外酵素によるDNA発現後の修飾などにより、所期の理化学的性質は保持しているものの、配列番号1又は2に示すアミノ酸配列におけるN末端付近のアミノ酸が1若しくは複数個、即ち、1個または2個以上、場合によっては、1乃至30個、或いは、1乃至20個、若しくは、1乃至10個欠失させたり、10 他のアミノ酸と置換したり、更にはN末端に1個または2個以上、場合によって、1乃至30個、或いは、1乃至20個、若しくは、1乃至10個のアミノ酸が新たに付加した変異体が生成することがある。斯かる変異体であっても、それが所望の理化学的性質を具備している限り、当然、本発明のポリペプチドに包含されることは言うまでもない。

本発明のポリペプチドは、本発明のDNAを適宜宿主に導入し、得ら

れる形質転換体の培養物から採取することができる。本発明で使用する形質転換体としては、例えば、配列表における配列番号 3 又は 4 に示す 5' 末端からの塩基配列若しくは、その塩基配列において、1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加した塩基配列、または、それらに相補的な塩基配列若しくはそれらの塩基配列における 1 若しくは複数個を、遺伝子の縮重に基づき、それがコードするアミノ酸配列を変え
ることなく他の塩基で置換した塩基配列からなる DNA を含む形質転換体を例示できる。また、上記塩基配列として、遺伝子コードの縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変え
ることなく、塩基の 1 若しくは複数個、即ち、1 個または 2 個以上、場合によっては、1 乃至 190 個、或いは、1 乃至 60 個、若しくは、1 乃至 30 個を他の塩基に置き換えたものを例示できる。

本発明に係る DNA は、それが前述のような塩基配列を有する限り、それが天然由来のものであっても、人為的に合成されたものであってもよい。天然の給源としては、例えば、バチルス グロビスポルス C11 (FERM BP-7144) 及びバチルス グロビスポルス N75 (FERM BP-7591) を含むバチルス属の微生物が挙げられる。これら微生物の菌体から本発明の DNA を含む遺伝子を得ることができる。すなわち、斯かる微生物を栄養培地に接種し、好氣的条件下で約 1 乃至約 3 日間培養後、培養物から菌体を採取し、リゾチームや β -グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素や超音波で処理することにより当該 DNA を含む遺伝子を菌体外に溶出させる。このとき、プロテアーゼなどの蛋白質加水分解酵素を併用したり、SDS などの界面活性剤を共存させたり凍結融解してもよい。斯くして得られる処理物に、例えば、フェノール抽出、アルコール沈殿、遠心分離、リボヌクレアーゼ処理などの斯界における通常一般の方法を適用すれば目的の DNA が得られる。一方、D

N A を人為的に合成するには、例えば、配列表における配列番号 3 又は 4 に示す塩基配列に基づいて化学合成すればよい。また、当該 DNA を含む遺伝子を鋳型として、適当なプライマーとなる化学合成 DNA を用いて、PCR 合成することも有利に実施できる。このようにして化学合成した配列表における配列番号 1 又は 2 に示すアミノ酸配列をコードする DNA を自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換え DNA とし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から菌体を採取し、その菌体から当該 DNA を含む組換え DNA を採取すればよい。

10 斯かる DNA は、通常、組換え DNA の形態で宿主に導入される。組換え DNA は、通常、DNA と自律複製可能なベクターを含んでなり、DNA が入手できれば、通常一般の組換え DNA 技術により比較的容易に調製することができる。斯かるベクターの例としては、pBR322、pUC18、Blue script II SK(+)、pUB110、
15 pTZ4、pC194、pHV14、TRp7、YEp7、pBS7 などのプラスミドベクターや λ gt \cdot λ C、 λ gt \cdot λ B、 ρ 11、 ϕ 1、 ϕ 105 などのファージベクターが挙げられる。このうち、本発明の DNA を大腸菌で発現させるには、pBR322、pUC18、Blue script II SK(+)、 λ gt \cdot λ C および λ gt \cdot λ B が好
20 適であり、一方、枯草菌で発現させるには、pUB110、pTZ4、pC194、 ρ 11、 ϕ 1 および ϕ 105 が好適である。pHV14、TRp7、YEp7 および pBS7 は、組換え DNA を二種以上の宿主内で複製させる場合に有用である。DNA を斯かるベクターに挿入するには、斯界において通常一般の方法が採用される。具体的には、先ず、
25 DNA を含む遺伝子と自律複製可能なベクターとを制限酵素および／または超音波により切断し、次に、生成した DNA 断片とベクター断片と

を連結する。遺伝子およびベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、I型制限酵素、詳細には、*Sau* 3
A I、*Eco* R I、*Hind* I I I、*Bam* H I、*Sal* I、
X b a I、*Sac* I、*Pst* Iなどを使用すれば、DNA断片と
5 ベクター断片とを連結するのが容易である。必要に応じて、両者をアニー
リングした後、生体内または体外でDNAリガーゼを作用させれば
よい。斯くして得られる組換えDNAは、適宜宿主に導入して形質転換
体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

このようにして得られる組換えDNAは、大腸菌、枯草菌、放線菌、
10 酵母を始めとする適宜の宿主微生物に導入することができる。形質転換
体をクローニングするには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用
するか、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、
この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有す
るグルコース重合度が3以上の糖質を含む栄養培地で培養し、該糖質よ
15 り環状四糖を生成するものを選択すればよい。

斯くして得られる形質転換体は、栄養培地で培養すると、菌体内外に
本発明のポリペプチドを産生する。栄養培地には、通常、炭素源、窒素
源、ミネラル、更には、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量
栄養素を補足した通常一般の液体培地が使用される。個々の炭素源とし
20 ては、例えば、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖、 α 、
 α -トレハロース、 α 、 β -トレハロース、 β 、 β -トレハロースなど
の糖質が、また、窒素源としては、例えば、アンモニアおよびその塩類、
尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンステープリ
カー、肉エキスなどの含窒素無機/有機物が挙げられる。形質転換体を
25 斯かる栄養培地に接種し、栄養培地を温度20乃至40℃、pH2乃至
10に保ちつつ、通気攪拌などによる好氣的条件下で約1乃至約6日間

培養すれば、当該ポリペプチドを含む培養物が得られる。この培養物は酵素剤としてそのまま使用可能であるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、浸透圧ショックや界面活性剤により菌体から抽出したり、超音波や細胞溶解酵素により菌体を破碎した後、濾過、遠心分離などにより

5 本発明のポリペプチドを菌体または菌体破碎物から分離し、精製する。その精製方法としては、通常、ポリペプチドを精製するための通常の方法が採用でき、例えば、菌体または菌体破碎物を除去した培養物に、濃縮、塩析、透析、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロ

10 マトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの一種または二種以上を適宜組合わせて適用すればよい。

本発明のポリペプチドは、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から環状四糖

15 を生成する酵素活性を有し、かつ、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列若しくは、そのアミノ配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列を有するという従来の酵素には見られない独特の性質を有する。生成した環状四糖は、非還元性であるが故に、アミノカルボニル反応を起こさず、褐変や

20 劣化が少ないと共に、環状糖質の故にエチルアルコールや酢酸など揮発成分との包接能を有しており、更には、過度の甘味によって食品本来の風味を損なうことの少ない温和で低甘味な糖質であり、難発酵性、難消化性で食物繊維として好適であるなど有用な特性を有している。

環状四糖の生成方法につき説明する。当該環状四糖は、本発明のポリ

25 ペプチドをその基質、即ち、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$

グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質に作用させることにより得ることができる。斯かる糖質としては、澱粉、アミロペクチン、アミロース、グリコーゲンなどの澱粉または澱粉質やそれらを酸および／またはアミラーゼで部分加水分解したものを、 α -グルコシダーゼ、デキストリンデキストラナーゼ、先に本発明者等がPCT/JPO1/06412号明細書で開示した、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素などによって糖転移させて得られる糖質、或いは、プルランを β -アミラーゼとプルラナーゼ共存下で加水分解することにより得られる糖質を例示することができる。これら糖質としては、通常、 $6^2-O-\alpha$ -グルコシルマルトース、 $6^3-O-\alpha$ -グルコシルマルトトリオース、 $6^4-O-\alpha$ -グルコシルマルトテトラオース、 $6^5-O-\alpha$ -グルコシルマバノースなどの非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質の一種または二種以上の糖質を例示することができる。

本発明のポリペプチドを用いての環状四糖の生成方法に於いては、上記した非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質が生成する前後に本発明のポリペプチドを共存させて、糖質が生成した後に作用させることも、当該糖質の生成開始時または生成途中で、本発明のポリペプチドを共存させて作用させることも随意である。通常、基質として上記したような糖質の一種または二種以上を含む水溶液などの適宜溶液中に本発明のポリペプチドを共存せしめ、水溶液を所定の温度、pHに保ちつつ、所望量の環状四糖が生成するまで反応させる。反応は0.1%程度の基質濃度下でも進行するが、環状四糖の生成方法を大規模に実施するには、より高濃度の

1 % (w / w) (以下、本明細書では、特にことわらない限り、「% (w / w)」を「%」と略称する。) 以上、望ましくは、5 乃至 50 % とするのがよい。反応温度は反応が進行する温度、すなわち 60 °C 付近までで行なえばよいが、好ましくは 30 乃至 50 °C 付近の温度を用いる。反応
5 pH は、通常、4、5 乃至 8 の範囲で調整すればよいが、好ましくは pH 約 5、5 乃至約 7 の範囲に調整する。本発明のポリペプチドの使用量と反応時間は密接に関係しており、目的とする反応の程度により適宜選択すればよい。反応に際しては、当該ポリペプチドを公知の手法で適宜担体に固定化して、固定化ポリペプチドとして用いることも随意である。
10

上記の反応によって得られた反応液は、通常、環状四糖と共にグルコース、マルトースなどマルトデキストリン、更には、非還元末端の結合様式として α -1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度 3 以上
15 のオリゴ糖などを含有しており、そのまま環状四糖含有糖液として用いることができる。必要に応じて、本発明のポリペプチドを作用させた後に、例えば、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよび α -グルコシダーゼから選ばれる一種または二種以上を作用させて、夾雑するオリゴ糖を加水分解した環状四糖含有液として用いることもで
20 きる。一般的には、更に、精製して用いられる。精製方法としては、公知の方法を適宜採用すればよく、例えば、活性炭での脱色、H 型、OH 型イオン交換樹脂での脱塩、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコールおよびアセトン
25 など有機溶媒による分別、適度な分離性能を有する膜による分離、更には、環状四糖を利用せず夾雑糖質を資化または分解する微生物、例え

ば、乳酸菌、酢酸菌、酵母などによる発酵処理、アルカリ処理などによる残存している還元性糖質の分解除去などの方法から選ばれる一種または二種以上の精製方法が有利に採用できる。とりわけ、工業的大量製造方法としては、イオン交換カラムクロマトグラフィーの採用が好適であり、例えば、特開昭58-23799号公報、特開昭58-72598号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより環状四糖以外の夾雑糖類を除去し、目的物の含量を向上させた環状四糖またはこれを含む糖質水溶液を有利に製造することができる。この際、固定床方式、移動床方式、疑似移動床方式、バッチ方式、半連続方式、連続方式のいずれの方式をも採用することができる。

このようにして得られた環状四糖、またはその含量を向上させ環状四糖高含有物は、通常、環状四糖を、固形物当り、10%以上、望ましくは40%以上含有する水溶液で、通常、これを濃縮し、シラップ状製品とする。更に、乾燥して粉末状製品にすることも随意である。更には、本発明における環状四糖の結晶を製造するには、通常、前記の精製方法を用いた、望ましくは環状四糖を、固形物当り約40%以上含有する糖質水溶液が用いられる。結晶の形態として、5乃至6含水結晶を製造する場合には、通常、この糖質水溶液を環状四糖の過飽和水溶液、例えば、濃度約40%乃至約90%水溶液とし、これを助晶缶にとり、約0.1乃至約20%の種結晶共存下で、過飽和を保つ温度、望ましくは、10乃至90℃の範囲で、攪拌しつつ徐冷し、結晶を含有するマスキットを製造する。環状四糖1含水結晶や無水結晶を晶出させる場合には、一般的には、更に高濃度、高温度での過飽和条件が採用される。マスキットから結晶またはこれを含有する含蜜結晶を製造する方法は、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法など公知の方

法を採用すればよい。環状四糖 1 含水結晶や無水結晶は環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を脱水または乾燥させて製造することもできる。このようにして製造される環状四糖結晶またはこれの高含有粉末は、上品で温和な低甘味を有する非還元性乃至低還元性の白色粉末で、耐酸性、耐熱性に
5 優れた安定な糖質であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸を有する物質と混合、加工しても、褐変すること、異臭を発生することも少なく、混合した他の素材を損なうことも少ない。また、吸湿性も低く、粉末状物の付着、固結を防止できる。

また、環状四糖自体は、包接能を有していることから、香気成分、有効成分などの揮散、品質劣化が防止されることから、香気成分、有効成分の安定化保持に極めて優れており、保香剤、安定剤などとして好適である。この際、必要ならば、他の環状糖質、例えば、環状デキストリン類、分岐環状デキストリン類、環状デキストラン類、環状フラクタン類などを併用して、安定化を強化することも有利に実施できる。

15 更に、環状四糖自体は、アミラーゼや α -グルコシダーゼによって分解されないことから、経口摂取しても消化吸収されず、また、腸内細菌によって醗酵されにくく、極めて低カロリーの水溶性食物繊維として利用することができる。換言すれば、環状四糖を摂取すれば、糖質としての重量、容量があるので、満腹感が得られものの実質的に消化されず、
20 低カロリー食品素材、ダイエット食品素材として好適である。また、虫歯誘発菌などによっても、醗酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料としても利用できる。

更に、環状四糖自体は、耐酸性、耐アルカリ性、耐熱性に優れた無毒、無害の天然甘味料である。また安定な甘味料であることにより、結晶製品の場合には、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロ
25 リドンなどの結合剤と併用して錠剤と糖衣錠として利用することも有利

に実施できる。また、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、離水防止性、固結防止性、保香性、安定性、他の糖類の晶出防止性、難醗酵性、澱粉老化防止性、蛋白質変性防止性、脂質劣化防止性などの性質を具備している。

- 5 従って、環状四糖またはこれを含む糖質は、甘味料、難醗酵性食品素材、難消化性食品素材、低う蝕性食品素材、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、固結防止剤、保香剤、澱粉老化防止剤、蛋白質変性防止剤、脂質劣化防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、そのままで、または必要に応じて、当
- 10 該糖質と公知材料とを適宜併用してして、各種組成物、例えば、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、化粧品、医薬品などのに有利に利用できる。公知の材料としては、例えば、呈味料、着色料、着香料、強化剤、乳化剤、酸化防止剤、紫外線防止剤、薬効成分などが適宜利用できる。

- 環状四糖またはこれを含む糖質は、そのまま甘味付のための調味料として使用できる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、果糖、異性化
- 15 糖、砂糖、麦芽糖、 α 、 α -トレハロース、 α 、 β -トレハロース、 β 、 β -トレハロース、蜂蜜、メープルシュガー、エリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 α -グリコシルステビオシド、ラカンカ甘味物、グリチルリチン、
- 20 ソーマチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK、スクラロース、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料と併用して使用することも、また、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と混合して使用することもできる。とりわけ、エリスリトール、キシリトール、マルチトールなどの低カロリー
- 25 甘味料や、 α -グリコシルステビオシド、ソーマチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファ

ムK、スクラロースなどの高甘味度甘味料などと併用して、低カロリー甘味料またはダイエット甘味料などとして利用することも好適である。

また、環状四糖またはこれを含む糖質の粉末乃至結晶状製品は、そのままで、または必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、
5 顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成形して使用することも随意である。

更に、環状四糖またはこれを含む糖質の甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種の物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付、呈味改良に、風味改良に、
10 また品質改良などに有利に利用できる。例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、焼き肉のたれ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなどの各種調味料へ甘味料、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤などとして使用することも有利に実施できる。また、例えば、せんべい、あられ、おこし、求肥、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、
15 カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、ヌガー、キャンディーなどの各種洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナツペースト、フルーツペーストなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べ
20 ったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜

漬の素などの漬物の素、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、
魚肉ソーセージ、カマボコ、チクワ、天ぷらなどの魚肉製品、ウに、イ
カの塩辛、酢コンブ、さきするめ、ふぐのみりん干し、タラ、タイ、エ
ビなどの田麩などの各種珍味類、海苔、山菜、するめ、小魚、貝などで
5 製造される佃煮類、煮豆、ポテトサラダ、コンブ巻などの惣菜食品、乳
製品、魚肉、畜肉、果実、野菜の瓶詰、缶詰類、合成酒、増醸酒、果実
酒、酒などの酒類、珈琲、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳
酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、
即席ジュース、即席コーヒー、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、
10 更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、アミノ酸含有飲料、ペプチド食
品、冷凍食品などの各種飲食物への甘味付に、呈味改良に、風味改良に、
品質改良などに有利に実施できる。

また、家畜、家禽、その他は蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のための飼
料、餌料など嗜好性を向上またはカロリーを低減させるなどの目的で使
15 用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、
内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うが
い剤など各種の固形物、ペースト状、液状などの嗜好物、化粧品、医薬
品などの各種組成物への甘味剤として、または呈味改良剤、矯味剤とし
て、更に品質改良剤、安定剤などとして有利に利用できる。品質改良剤、
20 安定剤としては、有効成分、活性など失い易い各種生理活性物質または
これを含む健康食品、化粧品、医薬品などに有利に適用できる。例えば、
インターフェロナー α 、インターフェロナー β 、インターフェロナー γ 、
ツモア・ネクロシス・ファクター α 、ツモア・ネクロシス・ファク
ター β 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスフ
25 ァーファクター、インターロイキン11などのサイトカイン含有液、イ
ンシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞

刺激ホルモンなどのホルモン含有液、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤含有液、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質含有液、チアミン、リボフラビン、レーアスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン含有液、リパーゼ、エステラーゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素含有液、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、クマザサエキス、モモの葉エキス、ビワの葉エキス、ユズの皮エキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌ペースト、ローヤルゼリーなどの各種生理活性物質も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の液状、ペースト状または固状の健康食品、化粧品、医薬品などを容易に製造できることとなる。

以上述べたような各種組成物に環状四糖またはこれを含む糖質を含有させる方法としては、その製品が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、混捏、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶析、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その配合量は、環状四糖の種々の特性、とりわけ包接作用、呈味改良、風味改良などを発揮させるためには、環状四糖として、固形物当たり0.1%未満では不十分で、通常0.1%以上、望ましくは1%以上含有せしめるのが好適である。

以下、実施例により、本発明のポリペプチドの製造方法、それを用いる環状四糖、またはそれを含む糖質の製造方法について具体的に説明する。

実施例 1 ポリペプチドの製造

澱粉部分分物『バインデックス # 4』5 g / L、ポリペプトン 20 g / L、酵母エキス 20 g / L およびリン酸一水素ナトリウム 1 g / L を含む水溶液を 500 ml 容三角フラスコに 100 ml 入れ、オートクレーブで 121℃ で 15 分間処理し、冷却し、無菌的に pH 7.0 に調製した後、アンピシリンナトリウム塩を 100 μ g / ml 加えた。この液体培地に実験 5-2 の方法で得た形質転換体 BGC1 を接種し、37℃、230 rpm で 24 時間回転振盪培養して種培養液を得た。次に、30 L 容ファーマンターに上記と同じ組成の液体培地を約 18 L とり、同様に滅菌し、27℃ まで冷却後、アンピシリンナトリウム塩を 50 μ g / ml 加え、種培養液を 1% (v / v) 接種し、27℃ で 48 時間通気培養した。培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の本発明のポリペプチドの α -イソマルトシル転移酵素活性を測定したところ、培養物 1 L 当り、約 3,100 単位の酵素活性が検出された。この上清を用いて実験 1 の方法により精製したところ、比活性約 30 単位 / mg 蛋白質の α -イソマルトシル転移酵素活性を有する本発明のポリペプチドを 1 ml 当り約 135 単位含む水溶液が約 74 ml 得られた。

20

実施例 2 ポリペプチドの製造

実施例 1 に記載した方法に準じて、実験 6-2 で得た形質転換体 BGN1 を種培養した後、30 L 容ファーマンターを用いて主培養した。得られた培養物を超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去後、上清中の本発明のポリペプチドの α -イソマルトシル転移酵素活性を測定したところ、培養物 1 L 当り、約 3,000 単位の酵素活性

25

が検出された。この上清を用いて実験 3 の方法により精製したところ、比活性約 30 単位 / mg 蛋白質の α -イソマルトシル転移酵素集合戦を有する本発明のポリペプチドを 1 ml 当たり約 72 単位含む水溶液が約 150 ml 得られた。

5

実施例 3 環状四糖を含む粉状物の製造

パノース（株式会社林原生物化学研究所製）を 10% 濃度になるように水に溶解させた後、pH 6.0、温度 35℃ に調製し、これに実施例 1 の方法で得た酵素ポリペプチドをパノース 1 グラム当たり 2 単位の割合になるように加え、36 時間反応させた。その反応液を 95℃ に加熱し 10 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H 型および OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に、濃縮し、乾燥し、粉碎して、環状四糖含有粉末を固形物当たり収率約 91% で得た。

15 本品は、固形物当たり、グルコース 34%、イソマルトース 2.1%、パノース 2.3%、環状四糖 45.0%、イソマルトシルパノース 4.8%、イソマルトシルパノシド 1.8%、およびその他の糖質を 10.0% 含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接
20 剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など組成物に有利に利用できる。

実施例 4 環状四糖を含むシロップ状組成物の製造

粉末マルトース（登録商標『サンマルト』、株式会社林原製）を 30%
25 水溶液とし、これに α -グルコシダーゼを含有する酵素剤（天野製薬株式会社、商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』）をマルトー

ス固形物当たり 0.08% 加え、pH 5.5 に調整し、55℃ で 18 時間反応させ、次いで加熱失活させた後、pH 6.0、温度 35℃ に調製し、これに実施例 1 の方法で得た酵素ポリペプチドを固形物 1 グラム当たり 2 単位の割合になるように加え、36 時間反応させた。その反応液を 95℃ に加熱し 10 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H 型および OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 70% のシラップを固形物当たり収率約 92% で得た。

本品は、固形物当たり、グルコース 32.5%、マルトース 15.7%、イソマルトース 9.8%、マルトトリオース 4.0%、パノース 0.3%、イソマルトトリオース 1.6%、環状四糖 17.5%、イソマルトシルパノース 1.2%、イソマルトシルパノシド 0.7%、およびその他の糖質を 16.7% 含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの組成物に有利に利用できる。

実施例 5 環状四糖結晶粉末の製造

15% 馬鈴薯澱粉乳に最終濃度 0.1% となるように炭酸カルシウムを加えた後、pH 6.0 に調整し、これに α -アミラーゼ（ノボ社製、商品名『ターマミール 60 L』）を澱粉 1 グラム当たり 0.2% になるように加え、95℃ で 15 分間反応させた。その反応液を 2 kg/cm² の圧力下、30 分間オートクレーブを行った後、35℃ に冷却し、これに実施例 1 の方法で得た本発明のポリペプチドを澱粉 1 グラム当たり 7.5 単位と実験 1-3 の方法で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を澱粉 1 グラム当たり 2 単位の割合になるように加え、更にシクロマルト

デキストリングルカノトランスフェラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）を澱粉 1 グラム当たり 10 単位になるように加え、48 時間反応させた。その反応液を 95℃ で 30 分間保った後、濃度 5%、pH 5.0、温度 45℃ に調整した後、 α -グルコシダーゼ剤（『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』）、グルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製）を固形物 1 グラム当たりそれぞれ 1,500 単位および 75 単位添加し、24 時間反応させて、その反応液を 95℃ に加熱して 30 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H 型および OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 60% のシラップを得た。本シラップは、固形物当り、グルコース 27.4%、環状四糖 65.1%、その他の糖質を 7.5% 含有していた。得られた糖液を、強酸性カチオン交換樹脂（『アンバーライト CR-1310、Na 型』、オルガノ株式会社製）を用いてカラム分画を行なった。樹脂を内径 5.4 cm のジャケット付きステンレス製カラム 4 本に充填し、これらカラムを直列につないで樹脂層全長 20 m とした。カラム内温度を 60℃ に維持しつつ、糖液を樹脂に対して 5 v/v% 加え、これに 60℃ の温水を SV 0.13 で流して分画し、溶出液の糖組成を HPLC でモニターし、環状四糖高含有画分を採取し、環状四糖高含有液を固形物当たり収率約 21% で得た。本溶液は、固形物当たり約 98% の環状四糖を含有していた。

本溶液を濃度約 70% に濃縮した後、助晶缶にとり、種晶として環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を約 2% を加えて徐冷し、晶出率約 45% のマスキットを得た。本マスキットを乾燥搭上のノズルより 1.50 kg/cm² の高圧にて噴霧した。これと同時に 85℃ の熱風を乾燥搭の上部より送風し、底部に設けた移送用金網コンベア上に結晶粉末を捕集し、コンベアの下より 45℃ の温風を送りつつ、該粉末を乾燥搭外に徐々に移動

させながら取り出した。この結晶粉末を熟成塔に充填して温風を送りつつ、10時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、環状四糖5乃至6含水結晶粉末を得た。

- 本品は、還元性が極めて低く、アミノカルボニル反応を起こしにくく、
- 5 吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性、を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの組成物に有利に利用できる。

10

実施例6 環状四糖結晶粉末の製造

- とうもろこし澱粉を濃度約28%の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウムを0.1%加え、pH6.5に調整し、 α -アミラーゼ（商品名『ターマミール60L』、ノボ社製）を澱粉グラム当たり0.3%加え、95℃
- 15 で15分間反応させ、その反応液を2kg/cm²の圧力下、30分間オートクレーブした。その後、50℃に冷却し、これに実施例2で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する本発明のポリペプチドを澱粉グラム当たり6単位と、実験3-3で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を澱粉グラム当たり1.8単位添加し、更にシクロマルトデ
- 20 キストリングルカノトランスフェラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）を澱粉グラム当たり1単位添加し、72時間反応させた。得られた反応液を95℃で30分間保った後、pH5.0に調整した後、温度50℃に調整した後、 α -グルコシダーゼ剤（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬株式会社製）を固形物グラム当たり30
- 25 0単位加え、24時間反応させ、更にグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業（株）製）及び α -アミラーゼ剤（商品

名『ネオスピターゼ PK2』)を固形物グラム当たりそれぞれ10単位及び20単位添加し、17時間反応させて、その反応液を95℃に加熱し30分間保った後、冷却し、濾過し、得られる濾液を常法に従って活性炭で脱色し、H形及びOH形イオン交換樹脂により脱塩して精製し、
5 更に濃縮して濃度60%シラップを得た。

本シラップは、固形物当り、グルコース35.1%、環状四糖51.1%、その他の糖質を13.8%含有していた。本糖液を用いて、実施例5に記載の強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラム分画を行って環状四糖高含有画分を採取し、環状四糖高含有画分を固形物当たり収率約3
10 9%で得た。本溶液は、固形物当たり約80%の環状四糖を含有していた。

本溶液を濃縮しながら連続晶析させ、得られるマスキットをバスケット型遠心分離機で分離し、結晶を少量の水で噴霧洗浄して、高純度の環状四糖5乃至6含水結晶を固形物当たり約23%の収率で得た。

15 本品は、還元性が極めて低く、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易で、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利
20 に利用できる。

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明は、 α -イソマルトシル転移酵素活性を有する新規なポリペプチド、その製造方法および用途を提供する発明で
25 ある。本発明のポリペプチドは、遺伝子組換え技術により大量かつ安価に安定して供給できることから、当該ポリペプチドを用いて、サイクロ

- { $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル-($1 \rightarrow 3$)- α -D-グルコピラノシル-($1 \rightarrow 6$)- α -D-グルコピラノシル-($1 \rightarrow 3$)- α -D-グルコピラノシル-($1 \rightarrow$)の構造を有する環状四糖、これを含む混合糖質及び各種組成物を、工業的に大量かつ安価に安定に製造することが可能となった。当該ポリペプチドを用いて得られる環状四糖は、還元性が極めて低く、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性、を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化
- 5
- 10 基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの組成物に有利に利用できる。

本発明は斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義ある発明と言える。

請求の範囲

1. 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から、 α -イソマルトシル転移することによって、サイクロ $\{\rightarrow 6\}-\alpha-D$ -グルコピラノシルー $(1\rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシルー $(1\rightarrow 6)-\alpha-D$ -グルコピラノシルー $(1\rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシルー $(1\rightarrow)$ の構造を有する糖質を生成する酵素活性を有し、かつ、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列若しくは、それらのアミノ配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチド。
2. 下記の理化学的性質を有する請求の範囲第1項記載のポリペプチド。
- 15 (1) 分子量
- S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、約82,000乃至132,000ダルトン
- (2) 至適温度
- p H 6.0、30分間反応で、約50℃
- 20 (3) 至適 p H
- 35℃、30分間反応で、p H 約5.5乃至6.0
- (4) 温度安定性
- p H 6.0、60分間保持で、約45℃以下に温度安定域を有する。
- (5) p H 安定性
- 25 4℃、24時間保持で、p H 約4.5乃至10.0の範囲内にp H 安定域を有する。

3. 請求の範囲第1項または第2項記載のポリペプチドをコードするDNA。
4. 配列表における配列番号3又は4に示す塩基配列若しくは、それらの塩基配列において、1若しくは複数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加した塩基配列、または、それらに相補的な塩基配列若しくはそれらの塩基配列における1若しくは複数個を、遺伝子の縮重に基づき、それがコードするアミノ酸配列を変えことなく他の塩基で置換した塩基配列を含有する、請求の範囲第3記載のDNA。
5. 遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1又は2に示すアミノ酸配列を変えことなく、配列表における配列番号3又は4に示す塩基配列における塩基の1若しくは複数個を他の塩基で置換した請求の範囲第3項または第4項記載のDNA。
6. バチルス属の微生物に由来する請求の範囲第3項、第4項または第5項記載のDNA。
7. 請求の範囲第3項乃至第6項のいずれかに記載のDNAと、自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNA。
8. 自律複製可能なベクターが、プラスミドベクター *Blue script II SK(+)* である請求の範囲第7項記載の複製可能な組換えDNA。
9. 請求の範囲第7項または第8項記載の組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体。
10. 宿主が大腸菌である請求の範囲第9項記載の形質転換体。
11. 請求の範囲第9項または第10項記載の形質転換体を培養し、培養物から請求の範囲第1項または第2項記載のポリペプチドを採取することを特徴とするポリペプチドの製造方法。
12. 培養物中の請求の範囲第1項または第2項記載のポリペプチド

を、遠心分離、濾過、濃縮、塩析、透析、分別沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動および等電点電気泳動から選ばれる一種または二種以上の方法により採取する請求項 11 記

5 戦のポリペプチドの製造方法。

13. 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質に、請求の範囲第1項または第2項記載のポリペプチドを作用させてサイクロ $\{\rightarrow 6\}-\alpha-D$ -グルコピ

10 ラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）- α -D-グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 6$ ）- α -
D-グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）- α -D-グルコピラノシルー（ 1
 \rightarrow } の構造を有する糖質を生成させる工程を含んでなる、サイクロ {
6} - α -D-グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）- α -D-グルコピラノ
シルー（ $1 \rightarrow 6$ ）- α -D-グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）- α -D-
15 グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow$ } の構造を有する糖質の製造方法。

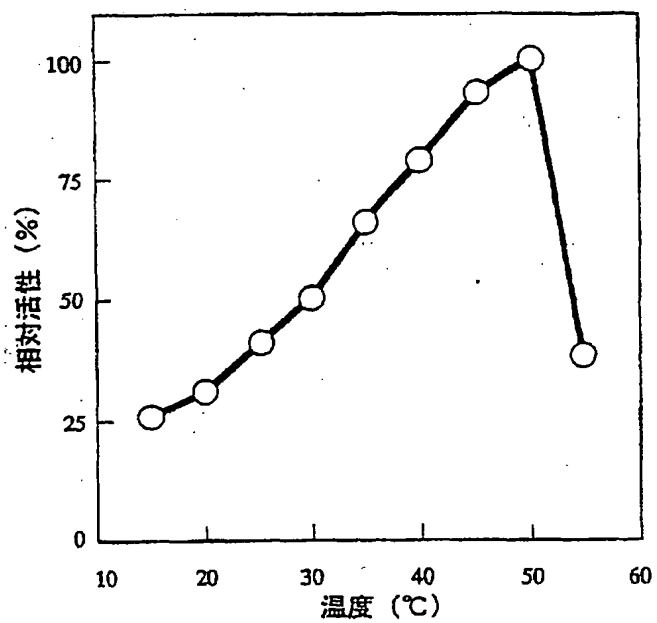
14. 非還元末端の結合様式として $\alpha-1$ 、6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1$ 、4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質が、澱粉、澱粉質またはそれらを酸および/またはアミラーゼで部分加水分解したものを、 α -グルコシダーゼ、デキストリンデキストラナーゼ、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を用いて糖転移させたものである請求の範囲第13項記載のサイクロ $\{\rightarrow 6\}-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1\rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1\rightarrow 6)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1\rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1\rightarrow)$ の構造を有する糖質の製造方法。

25 15. 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、
この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有す

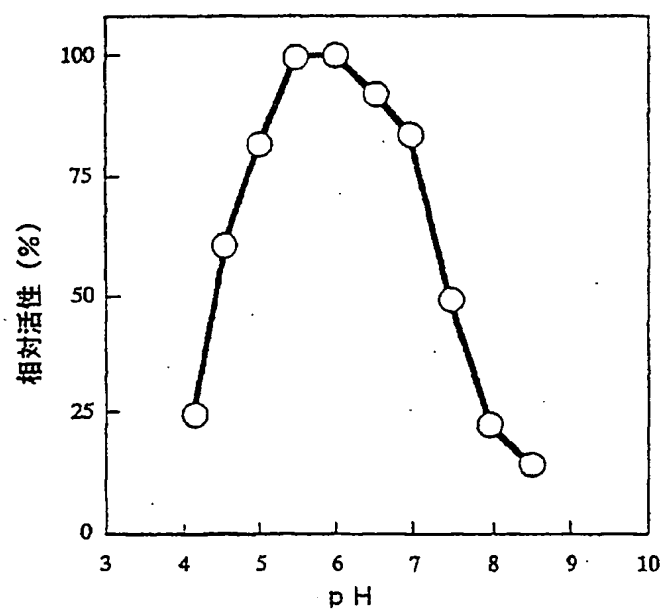
るグルコース重合度が3以上の糖質が、プルランを β -アミラーゼと
プルナーゼ共存下で加水分解して得られたものである、請求の範囲第1
3項または第14項記載のサイクロ $\{\rightarrow 6\}-\alpha-D$ -グルコピラノシ
ル $-(1\rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1\rightarrow 6)-\alpha-D$ -グ
5 ルコピラノシル $-(1\rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1\rightarrow \}$ の
構造を有する糖質の製造方法。

16. 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、
この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有す
るグルコース重合度が3以上の糖質が、 $6^2-O-\alpha$ -グルコシルマル
10 トース、 $6^3-O-\alpha$ -グルコシルマルトリオース、 $6^4-O-\alpha$ -
グルコシルマルテトラオースおよび/または $6^5-O-\alpha$ -グルコシ
ルマバノースである、請求の範囲第13項、第14項または第15項記
載のサイクロ $\{\rightarrow 6\}-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1\rightarrow 3)-\alpha-D$ -
グルコピラノシル $-(1\rightarrow 6)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1$
15 $\rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1\rightarrow \}$ の構造を有する糖質の製
造方法。

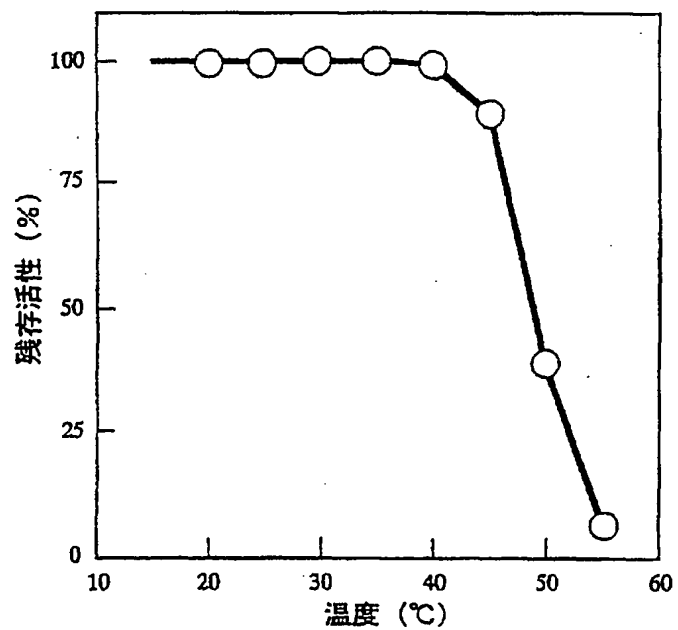
第1図



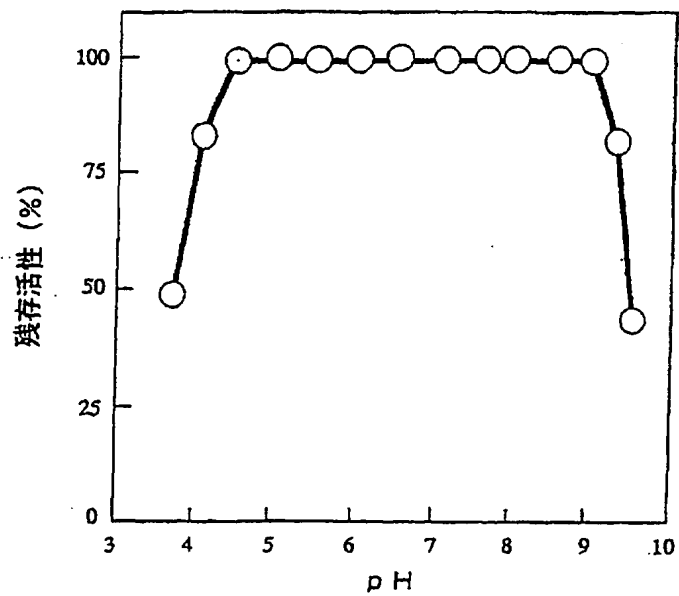
第2図



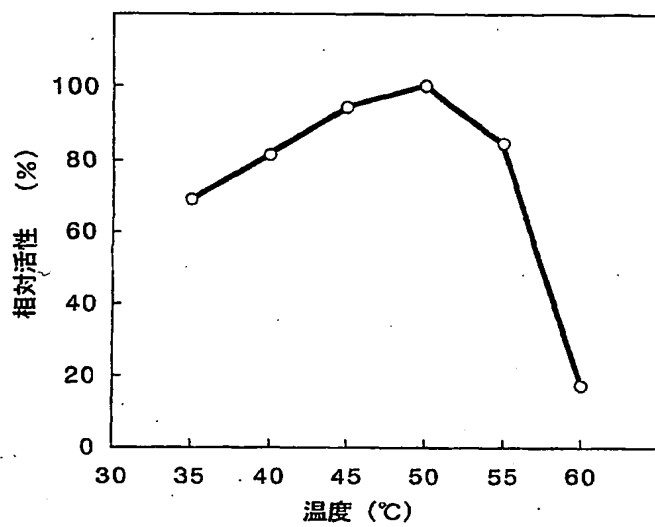
第3図



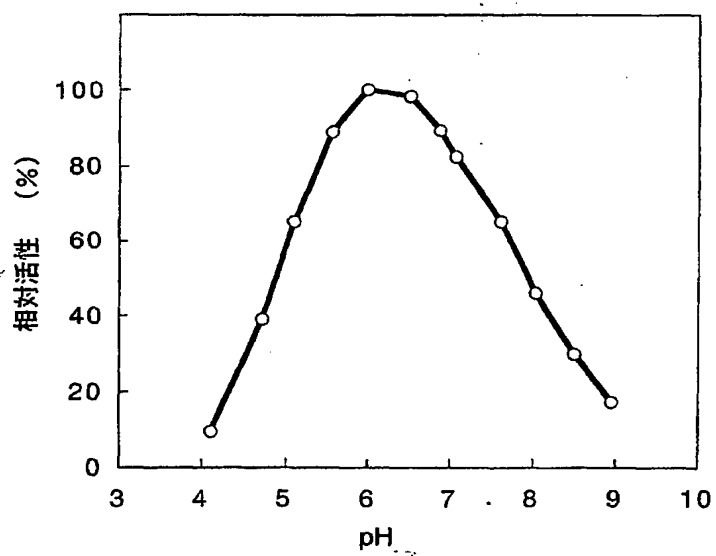
第4図



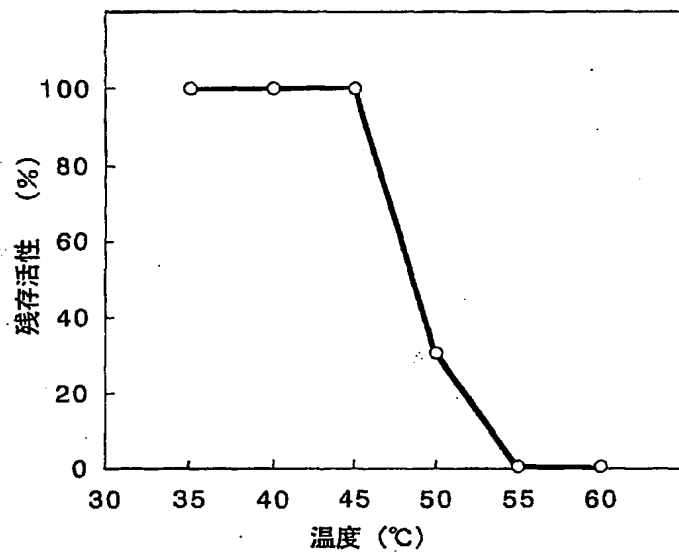
第5図



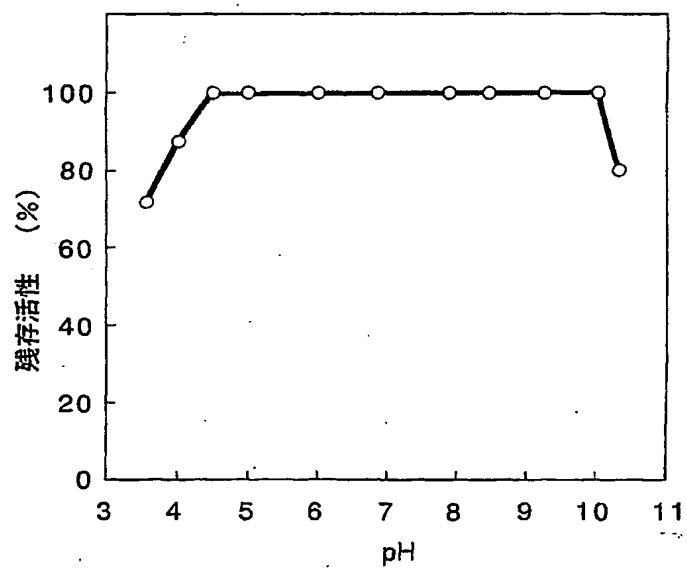
第6図



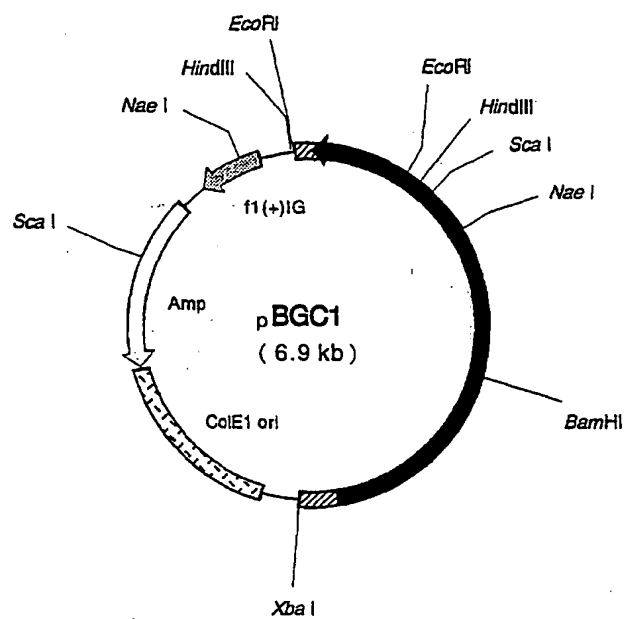
第7図



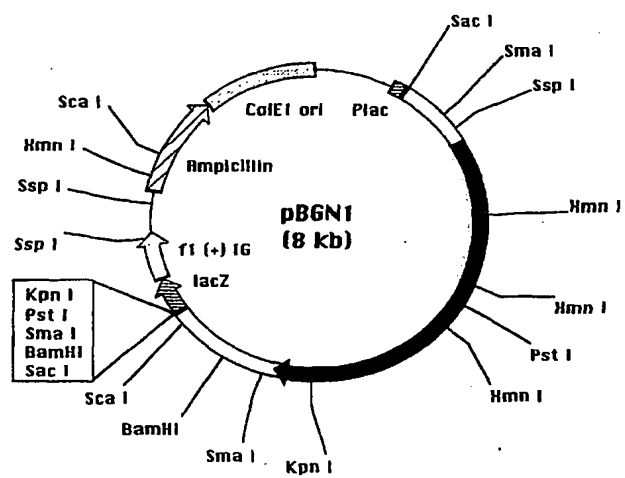
第8図



第9図



第10図



SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo
 <120> Polypeptide having α -isomaltosyl-transferring enzymatic activity
 <130> WO870
 <160> 16
 <210> 1
 <211> 1064
 <212> PRT
 <213> Microorganism
 <220>
 <400> 1

```

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Tyr Gly Ile Asp Asp Leu Tyr Glu
 1             5             10            15
Ile Gln Ala Thr Glu Arg Ser Pro Arg Asp Pro Val Ala Gly Asp Thr
      20             25            30
Val Tyr Ile Lys Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Ser Gly Gln Thr Ala
      35             40            45
Trp Val Thr Trp Thr Lys Asn Gly Val Asn Gln Ala Ala Val Gly Ala
      50             55            60
Ala Phe Lys Tyr Asn Ser Gly Asn Asn Thr Tyr Trp Glu Ala Asn Leu
      65             70            75            80
Gly Thr Phe Ala Lys Gly Asp Val Ile Ser Tyr Thr Val His Gly Asn
      85             90            95
Lys Asp Gly Ala Asn Glu Lys Val Ile Gly Pro Phe Thr Phe Thr Val
      100            105            110
Thr Gly Trp Glu Ser Val Ser Ser Ile Ser Ser Ile Thr Asp Asn Thr
      115            120            125
Asn Arg Val Val Leu Asn Ala Val Pro Asn Thr Gly Thr Leu Lys Pro
      130            135            140
Lys Ile Asn Leu Ser Phe Thr Ala Asp Asp Val Leu Arg Val Gln Val
      145            150            155            160
Ser Pro Thr Gly Thr Gly Thr Leu Ser Ser Gly Leu Ser Asn Tyr Thr
      165            170            175
Val Ser Asp Thr Ala Ser Thr Thr Trp Leu Thr Thr Ser Lys Leu Lys
      180            185            190
Val Lys Val Asp Lys Asn Pro Phe Lys Leu Ser Val Tyr Lys Pro Asp
  
```

785 790 795 800
 Ser Ile Leu Pro Met Asn Leu Asn Ala Gln Tyr Gln Val Gly Gly Thr
 805 810 815
 Ile Gly Asn Ser Leu Thr Ser Tyr Thr Asn Leu Ala Phe Arg Ile Tyr
 820 825 830
 Pro Leu Gly Thr Thr Thr Tyr Asp Trp Asn Asp Asp Ile Gly Gly Ser
 835 840 845
 Val Lys Thr Ile Thr Ser Thr Glu Gln Tyr Gly Leu Asn Lys Glu Thr
 850 855 860
 Val Thr Val Pro Ala Ile Asn Ser Thr Lys Thr Leu Gln Val Phe Thr
 865 870 875 880
 Thr Lys Pro Ser Ser Val Thr Val Gly Gly Ser Val Met Thr Glu Tyr
 885 890 895
 Ser Thr Leu Thr Ala Leu Thr Gly Ala Ser Thr Gly Trp Tyr Tyr Asp
 900 905 910
 Thr Val Gln Lys Phe Thr Tyr Val Lys Leu Gly Ser Ser Ala Ser Ala
 915 920 925
 Gln Ser Val Val Leu Asn Gly Val Asn Lys Val Glu Tyr Glu Ala Glu
 930 935 940
 Phe Gly Val Gln Ser Gly Val Ser Thr Asn Thr Asn His Ala Gly Tyr
 945 950 955 960
 Thr Gly Thr Gly Phe Val Asp Gly Phe Glu Thr Leu Gly Asp Asn Val
 965 970 975
 Ala Phe Asp Val Ser Val Lys Ala Ala Gly Thr Tyr Thr Met Lys Val
 980 985 990
 Arg Tyr Ser Ser Gly Ala Gly Asn Gly Ser Arg Ala Ile Tyr Val Asn
 995 1000 1005
 Asn Thr Lys Val Thr Asp Leu Ala Leu Pro Gln Thr Thr Ser Trp Asp
 1010 1015 1020
 Thr Trp Gly Thr Ala Thr Phe Ser Val Ser Leu Ser Thr Gly Leu Asn
 1025 1030 1035 1040
 Thr Val Lys Val Ser Tyr Asp Gly Thr Ser Ser Leu Gly Ile Asn Phe
 1045 1050 1055
 Asp Asn Ile Ala Ile Val Glu Gln
 1060

195	200	205
Gly Thr Thr Leu Ile Ala Arg Gln Tyr Asp Ser Thr Thr Asn Arg Asn		
210	215	220
Ile Ala Trp Leu Thr Asn Gly Ser Thr Ile Ile Asp Lys Val Glu Asp		
225	230	235
His Phe Tyr Ser Pro Ala Ser Glu Glu Phe Phe Gly Phe Gly Glu His		
245	250	255
Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Arg Gly Asn Asp Val Asp Thr Tyr Val Phe		
260	265	270
Asn Gln Tyr Lys Asn Gln Asn Asp Arg Thr Tyr Met Ala Ile Pro Phe		
275	280	285
Met Leu Asn Ser Ser Gly Tyr Gly Ile Phe Val Asn Ser Thr Tyr Tyr		
290	295	300
Ser Lys Phe Arg Leu Ala Thr Glu Arg Thr Asp Met Phe Ser Phe Thr		
305	310	315
Ala Asp Thr Gly Gly Ser Ala Ala Ser Met Leu Asp Tyr Tyr Phe Ile		
325	330	335
Tyr Gly Asn Asp Leu Lys Asn Val Val Ser Asn Tyr Ala Asn Ile Thr		
340	345	350
Gly Lys Pro Thr Ala Leu Pro Lys Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser		
355	360	365
Ala Asn Glu Trp Asp Arg Gln Thr Lys Val Asn Thr Ala Ile Asn Asn		
370	375	380
Ala Asn Ser Asn Asn Ile Pro Ala Thr Ala Val Val Leu Glu Gln Trp		
385	390	395
Ser Asp Glu Asn Thr Phe Tyr Ile Phe Asn Asp Ala Thr Tyr Thr Pro		
405	410	415
Lys Thr Gly Ser Ala Ala His Ala Tyr Thr Asp Phe Thr Phe Pro Thr		
420	425	430
Ser Gly Arg Trp Thr Asp Pro Lys Ala Met Ala Asp Asn Val His Asn		
435	440	445
Asn Gly Met Lys Leu Val Leu Trp Gln Val Pro Ile Gln Lys Trp Thr		
450	455	460
Ser Thr Pro Tyr Thr Gln Lys Asp Asn Asp Glu Ala Tyr Met Thr Ala		
465	470	475
Gln Asn Tyr Ala Val Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gln Tyr Arg Ile Pro		
485	490	495

Ser Gly Gln Trp Phe Glu Asn Ser Leu Leu Leu Asp Phe Thr Asn Thr
 500 505 510
 Ala Ala Lys Asn Trp Trp Met Ser Lys Arg Ala Tyr Leu Phe Asp Gly
 515 520 525
 Val Gly Ile Asp Gly Phe Lys Thr Asp Gly Gly Glu Met Val Trp Gly
 530 535 540
 Arg Ser Asn Thr Phe Ser Asn Gly Lys Lys Gly Asn Glu Met Arg Asn
 545 550 555 560
 Gln Tyr Pro Asn Glu Tyr Val Lys Ala Tyr Asn Glu Tyr Ala Arg Ser
 565 570 575
 Lys Lys Ala Asp Ala Val Ser Phe Ser Arg Ser Gly Thr Gln Gly Ala
 580 585 590
 Gln Ala Asn Gln Ile Phe Trp Ser Gly Asp Gln Glu Ser Thr Phe Gly
 595 600 605
 Ala Phe Gln Gln Ala Val Asn Ala Gly Leu Thr Ala Ser Met Ser Gly
 610 615 620
 Val Pro Tyr Trp Ser Trp Asp Met Ala Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Pro
 625 630 635 640
 Thr Ala Glu Leu Tyr Lys Arg Ala Thr Glu Met Ala Ala Phe Ala Pro
 645 650 655
 Val Met Gln Phe His Ser Glu Ser Asn Gly Ser Ser Gly Ile Asn Glu
 660 665 670
 Glu Arg Ser Pro Trp Asn Ala Gln Ala Arg Thr Gly Asp Asn Thr Ile
 675 680 685
 Ile Ser His Phe Ala Lys Tyr Thr Asn Thr Arg Met Asn Leu Leu Pro
 690 695 700
 Tyr Ile Tyr Ser Glu Ala Lys Met Ala Ser Asp Thr Gly Val Pro Met
 705 710 715 720
 Met Arg Ala Met Ala Leu Glu Tyr Pro Lys Asp Thr Asn Thr Tyr Gly
 725 730 735
 Leu Thr Gln Gln Tyr Met Phe Gly Gly Asn Leu Leu Ile Ala Pro Val
 740 745 750
 Met Asn Gln Gly Glu Thr Asn Lys Ser Ile Tyr Leu Pro Gln Gly Asp
 755 760 765
 Trp Ile Asp Phe Trp Phe Gly Ala Gln Arg Pro Gly Gly Arg Thr Ile
 770 775 780
 Ser Tyr Thr Ala Gly Ile Asp Asp Leu Pro Val Phe Val Lys Phe Gly

<210> 2

<211> 1064

<212> PRT

<213> Microorganism

<400> 2

```

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Tyr Gly Ile Asp Asp Leu Tyr Glu
 1             5             10             15
Ile Gln Ala Thr Glu Arg Ser Pro Arg Asp Pro Val Ala Gly Glu Thr
      20             25             30
Val Tyr Ile Lys Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Pro Gly Gln Thr Ala
      35             40             45
Trp Val Thr Trp Thr Lys Asn Gly Val Ala Gln Pro Ala Val Gly Ala
      50             55             60
Ala Tyr Lys Tyr Asn Ser Gly Asn Asn Thr Tyr Trp Glu Ala Asn Leu
      65             70             75             80
Gly Ser Phe Ala Lys Gly Asp Val Ile Ser Tyr Thr Val Arg Gly Asn
      85             90             95
Lys Asp Gly Ala Asn Glu Lys Thr Ala Gly Pro Phe Thr Phe Thr Val
      100            105            110
Thr Asp Trp Glu Tyr Val Ser Ser Ile Gly Ser Val Thr Asn Asn Thr
      115            120            125
Asn Arg Val Leu Leu Asn Ala Val Pro Asn Thr Gly Thr Leu Ser Pro
      130            135            140
Lys Ile Asn Ile Ser Phe Thr Ala Asp Asp Val Phe Arg Val Gln Leu
      145            150            155            160
Ser Pro Thr Gly Ser Gly Thr Leu Ser Thr Gly Leu Ser Asn Phe Thr
      165            170            175
Val Thr Asp Ser Ala Ser Thr Ala Trp Ile Ser Thr Ser Lys Leu Lys
      180            185            190
Leu Lys Val Asp Lys Asn Pro Phe Lys Leu Ser Val Tyr Lys Pro Asp
      195            200            205
Gly Thr Thr Leu Ile Ala Arg Gln Tyr Asp Ser Thr Ala Asn Arg Asn
      210            215            220
Leu Ala Trp Leu Thr Asn Gly Ser Thr Val Ile Asn Lys Ile Glu Asp
      225            230            235            240
His Phe Tyr Ser Pro Ala Ser Glu Glu Phe Phe Gly Phe Gly Glu Arg

```


835 840 845
 Val Lys Thr Ile Thr Ser Thr Glu Gln Tyr Gly Leu Asn Lys Glu Thr
 850 855 860
 Val Thr Leu Pro Ala Ile Asn Ser Ala Lys Thr Leu Gln Val Phe Thr
 865 870 875 880
 Thr Lys Pro Ser Ser Val Thr Leu Gly Gly Thr Ala Leu Thr Ala His
 885 890 895
 Ser Thr Leu Ser Ala Leu Ile Gly Ala Ser Ser Gly Trp Tyr Tyr Asp
 900 905 910
 Thr Val Gln Lys Leu Ala Tyr Val Lys Leu Gly Ala Ser Ser Ser Ala
 915 920 925
 Gln Thr Val Val Leu Asp Gly Val Asn Lys Val Glu Tyr Glu Ala Glu
 930 935 940
 Phe Gly Thr Leu Thr Gly Val Thr Thr Asn Thr Asn His Ala Gly Tyr
 945 950 955 960
 Met Gly Thr Gly Phe Val Asp Gly Phe Asp Ala Ala Gly Asp Ala Val
 965 970 975
 Thr Phe Asp Val Ser Val Lys Ala Ala Gly Thr Tyr Ala Leu Lys Val
 980 985 990
 Arg Tyr Ala Ser Ala Gly Gly Asn Ala Ser Arg Ala Ile Tyr Val Asn
 995 1000 1005
 Asn Ala Lys Val Thr Asp Leu Ala Leu Pro Ala Thr Ala Asn Trp Asp
 1010 1015 1020
 Thr Trp Gly Thr Ala Thr Val Asn Val Ala Leu Asn Ala Gly Tyr Asn
 1025 1030 1035 1040
 Ser Ile Lys Val Ser Tyr Asp Asn Thr Asn Thr Leu Gly Ile Asn Leu
 1045 1050 1055
 Asp Asn Ile Ala Ile Val Glu His
 1060

<210> 3

<211> 3192

<212> DNA

<213> Microorganism

<400> 3

attgatggig tttatcatgc gccatcagga atcgaatgaic tglacgagat tcaggcgacg 60

gagcggagtc caagagatcc cgttgcaggc galactgigt atatcaagat aacaacgigg 120
 cccattgaat caggacaaac ggcttgggtg acctggacga aaaacggigt caatcaagct 180
 gcigtcggag cagcattcaa atacaacagc ggcaacaaca ctctacigga agcgaacctt 240
 ggccatttgg caaaagggga cgigatcagt tataccgttc atggcaacaa ggaaggcgcg 300
 aatgagaagg ttatcgggcc ttttactttt accgtaacgg gatgggaalc cgttagcagt 360
 atcagctcia ttacggataa tacgaacctt gtgtgtctga atcggtgcc gaatacaggc 420
 acattgaagc caaagatcaa cctttccctt accggcgaag atgicctccg cgtacagggt 480
 tctccaaccg gaacaggaac gttaagcagt ggacttagta attacacagt tttagatacc 540
 gcctcaacca ctggcttac aacttcaag ctgaaggta aggtggataa gaatccattc 600
 aaacttagtg tglataagcc tgaiggaacg acgttgatg ccgctcaata tgacagcact 660
 acgaatcgtt acattgccgt gttaaccaat ggccagtaaa tcatcgaca ggtagaagat 720
 cttttttatt caccggcttc cgaggagttt ttggcttgg gagagcatta caacaacttc 780
 cgtlaacgcg gaaatgatgt ggacacctat gtgtcaacc aglataagaa tcaaatgac 840
 cgcacctaca tggcaattcc ttttaigctt aacagcagcg gttatggcat ttctgtaaat 900
 tcaacgtatt aticcaaatt tcggttggca accgaacgca ccgatagtt cagctttacg 960
 gcigatacag ggggttagtg cggctcgaig ctggattatt atticattta cggtaattga 1020
 ttgaaaaatg tggtaglaa ctacgciaac attaccggta agccaacagc gctgccgaaa 1080
 tgggttttcg ggttatggat gtcagctaac gagtgggac gtcaaaccaa ggtgaatata 1140
 gccatttaata acggaactc caataatatt ccggctacag cggttgtgt cgaacagtgg 1200
 aglgtatgaga acacgtttta tttttcaat gaigccacct ataccccgaa aacgggcagt 1260
 gcigcgcag cciataccga ttacatttc ccgacatcgt ggagatggac ggaatcaaaa 1320
 gcgatggcag acaatgtgca taacaatggg atgaagctgg tgctttggca ggicctatt 1380
 cagaaatgga cttaacgcc ctalaccag aaagataatg atgaagccta tatgacggct 1440
 cagaattatg cagttggcaa cggtagcgga ggccagtaca ggataccttc aggacaatgg 1500
 ttcgagaaca gtgtgtgtt tgattttacg aatcggccg ccaaaaactg gtggatgtct 1560
 aaacgcgtt atcgtttga tgggtgggt atcgacggct tcaaacaga tggcggtaga 1620
 atggtatggg gtcgtcaaa tactttctca aacggtaaga aaggcaatga aatgcgcaat 1680
 caataccgga atgaglatgt gaaagcctat aacgagtacg cgcgtcga gaaagccgat 1740
 gcggtctcct tttagccgttc cggcacgcaa ggccacagc cgaatcagat ttctgtgtcc 1800
 ggtgaccaag agtcgacgtt tgggtcttt caacaagctg tgaatgcagg gcttacggca 1860
 aglatgtctg gcgttctta ttggagctgg gatattggcag gctttacagg cacttatcca 1920
 accgttagt tglacaaacg tctactgaa atggctgtt ttgcaccgtt catcagttt 1980
 catccgagt ctaacggcag ctctggtaic aacgaggaac gtcttccaig gaacgcacaa 2040
 gcgcgtacag gcgacaatc gatcattag catittgcca aatatacgaa tacgcgcaig 2100
 aatttgcttc ctatatttta tagcgaagcg aagaatggta gtgatactgg cgttcccatg 2160
 atgcgcgcca tggcgttga atatccgaag gacacgaaca cgtacggtt gacacaacag 2220
 tatatgttcg gaggiaattt acttatgtt ccgttatga atcagggaga aacaacaag 2280

10/27

agtatttattc ttccgcaggg ggatiggatc gatttctggt tccggtgctca gcgttctggc 2340
 ggicgaacaa icagctacac ggccggcatc gatgatctac cggtttltgt gaagtttggc 2400
 agtatttcttc cgaatgaattt gaacgcgcaa tatcaagigg gcgggaccat tggcaacagc 2460
 ttgacgagci acacgaatci cgcgttccgc atttatccgc ttgggacaac aacgtacgac 2520
 tggatgaig atattggcgg ttccgtgaaa accataactt ciacagagca ataiggggtg 2580
 aataaagaaa ccgigactgt tccagcgatt aattctacca agacattgca agtgtttacg 2640
 actaagcctt cctcigtac gggtgggtggt tctgtgatga cagagtacag tactttaaci 2700
 gccctaacgg gagcgtcgac aggcgtggac tatgatactg tacagaaatt cacttacgtc 2760
 aagcttgggt caagtgatc tgcicaaicc gtgtgtctaa atggcgtaa taaggiggaa 2820
 tatgaagcag aattcggcgt gcaaagcggc gtttcaacga acacgaacca tgcaggttat 2880
 actggtacag gatttggga cggctttgag accttggag acaatgttg tttgatgtt 2940
 tccgtcaaag ccgcaggac ttatcgaig aaggttcgtt attcaiccg tgcaggcaat 3000
 ggctcaagag ccaictatgt gaataacacc aaagtgacgg accttgctt gccgcaaca 3060
 acaagctggg atacatgggg gactgctacg tttagcgcti cgtcagatc aggtctaac 3120
 acggtgaaag tcagctatga tggtaaccgt tcaattggca ttaatttcga taacatcgg 3180
 atgttagagc aa 3192

<210> 4

<211> 3192

<212> DNA

<213> Microorganism

<400> 4

atlgacggcg tataccacgc gccttacggg atcgacgaic ttatagat tcaggcgacg 60
 gagcgcatc cgagagacc ttggccggg gagacgggtt atatcaaat cacaacatgg 120
 ccgaltcagc ccggacagac ggcatgggtg acctggacga aaaacggcgt cggccagccg 180
 gcggtcgggt ccgcttaca gtacaacagc ggcaacaaca cctactggga ggccaacctg 240
 ggacgcttcg ccaaaggaga cgtaatctc tacaccgtc gcggcaataa ggacgggtgc 300
 aaigaaaaaa cggccggacc gtacacctt accgtaacg actgggaata cgtcagcagc 360
 atcggctcgg tcacgaataa cacgaaccgt gtcctgtcga atcgggtgcc gaacacgggg 420
 acgctgtccc ccaagalcaa catctgttc acggcggacg atgtgtccg cgtcagctc 480
 tcccttacgg gatcggggac gttagacagc ggcttagata attttaccgt cacggacagt 540
 gcgtccacgg cctggatctc tacaaccaaa ttaaagctga aggtggataa gaatccgttc 600
 aaactgagcg tglacaagcc ggacggcacg acgtgatcg cgcgccagta tgacagcacg 660
 gccaacgca atctcgttg cgtgaccaat ggacgacgt tcatcaataa aatcgaggac 720
 cacttctact cggcggcgtc cgaggagttt ttccgcttcg gggagcgtc caacaacttc 780
 cgcaagcgcg gaaccgacgt ggacacgtat gctiacaatc agtacaaaa tcaaacgac 840

cgcacctata tggcaalccc cttaagctg aacagcagcg ggtacggat ctctgtaa 900
iccacgtact aciccaaatt ccgttggca acigagcgct ccgataigta cagttttacg 960
gccgataccg ggggcagcgc caattcgacg ctggattact actttatita cggcaatgac 1020
tgaagggcg tctgtagcaa ttatgcgaac atcacaggca agccggctgc tctgcccata 1080
tggcggttgg gccctcggat gtcggccaat gagtgggacc ggcaatccaa agtagcgact 1140
gcgatacaata acgccaatac gaacaacatc ccggcgacgg ccgtcgtgct ggagcagtgg 1200
agttagcgaga atacgttcta tatgttcaac gatgcgcagt atacggccaa acctggcggc 1260
agcacacact cctatacgga ctatacttc ccggcgggcg gccgttggcc gaatccgaag 1320
caaatggcgg ataatgtaca cagtaacggg atgaagctgg tctgttggca ggtgccgatt 1380
cagaaatgga ccggcgctcc tcatctgcag aaggacaacg acgaaagcta tatgatcgcg 1440
caaaattatg ccgtaggcaa cggcagcgga ggccagttacc gcatccctag cgggcaatgg 1500
tttgagaaca gccgtctgct ggacttcacg aacccgagcg ccaaaaactg gtggatgtcc 1560
aagcgcgctt atctgttga tggcgctggc atcgacgggt tcaagacgga cggaggggag 1620
atggcttggg gccgttggaa cacgttcgcc aaiggcaaaa aaggcgaiga aatgcgcaac 1680
cagtaccgga acgattactg gaaggcctac aacgaataig ccgctcga gaaaagcgat 1740
gccgtcagct tcagccgttc gggcacgcaa gggcgcaag cgaatcagat ctctgtgtcc 1800
ggtagcagg aatcgactt cggtgcttc cagcaagccg tccaggcggg actgaccgca 1860
ggctgttccg gcgttccgta ttggagctgg gacttggctg gattaccggg cgttatccg 1920
tcggccgagc tatataaacg cgcgacggca atgtcggcat ttgccccgat tatgcagttc 1980
cactccgaag ccaacggcag ttccggcatc aatgaggagc ggtccccgtg gaatgcicag 2040
gcccggactg gcgacaacac gatcactagc catittgcca agtatacga caccggatg 2100
aacctgttc ctatattia cagcgaggct aaagcagcaa gcgatactgg cgtgccgatg 2160
atgcgcgca igggcgtgga gtatccgagc gataccaga cgtacggat gacgcagcag 2220
tacaatgtc gcggcagcct gctggtggcg ccgtcttga accaaggcga gacgaataag 2280
aatacttacc ttccgaagg agatggatc gacttctgt tggcgcgca gcgtccggc 2340
ggcgcaacga icagctacta cgcggcgctg gacgatctc ccgtcttctg gaagtcggc 2400
agcatcctgc cgaatgact gaacggcgag tatcaggtt gcggcacgat cggcaacagc 2460
ttgaccgctt acaacaacct gacgttccgg attatccac tgggtacgac gacgtacagc 2520
tggaatgat acatcgggcg ctgggtgaag acgattact cgcagagca gtaaggactg 2580
aataaagaga cgttagcgt tccggcgatc aactcgcgga agacgttcca ggtgttcacg 2640
accaagccgt cgtcgtgac gctggcgggc acggccctca ccgcatag cacattaagc 2700
gcatgatcg gcgttcttc cggctgtat tacgatacgg tgcataagct cgcctatgtg 2760
aagctcggcg ccagctatc ggcgcaaac gtcgtcttg acggcgta caaggctgag 2820
tatgaggctg agttcggcac acttaccggc gtcacgacca atacgaatca tgcggctat 2880
atgggtaccg gcttcttga cggcttcat gggcagggc atgcagtag ctctgacgta 2940
tccgcaaac cggccggcac gtaicgctc aaggctcgt acgttccgc tggggcaac 3000
gcttcacgcg ctatctatgt caacaacgc aaggtagcg atctggcgt tccggcaacg 3060

12/27

gccaaactggg acacctgggg gacggcaacc gicaacgtag ccitaaacgc cggctacaac 3120
tcgalcaagg tcagctacga caacaccaat acgctcggca ttaatctcga taacatigcg 3180
atcgiggagc at 3192

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> Microorganism

<400> 5

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Tyr Gly Ile Asp Asp Leu Tyr Glu

1

5

10

15

Ile Gln Ala

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Microorganism

<400> 6

Gly Asn Glu Met Arg Asn Gln Tyr Pro Asn Glu Tyr Val Lys

1

5

10

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Microorganism

<400> 7

Arg Gly Asn Asp Val Asp Thr Tyr Val Phe Asn Gln Tyr Lys

1

5

10

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Microorganism

13/27

<400> 8

Asn Trp Trp Met Ser Lys

1

5

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Microorganism

<400> 9

Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Ser Gly Gln Thr Ala

1

5

10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Microorganism

<400> 10

Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser Ala Asn Glu

1

5

10

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Microorganism

<400> 11

The Asp Gly Gly Glu Met Val Trp Gly Arg Trp Asn Thr Phe Ala Asn

1

5

10

15

Gly Lys

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> Microorganism

14/27

<400> 12

Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Pro Gly Gln Thr Ala Trp Val Thr Trp
1 5 10 15
Thr Lys

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Microorganism

<400> 13

Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser Ala Asn Glu Trp Asp Arg Glu Ser
1 5 10 15
Lys

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Microorganism

<400> 14

Asn Ile Tyr Leu Pro Gln Gly Asp Trp Ile Asp Phe Trp Phe Gly Ala
1 5 10 15
Gln Arg Pro Gly

<210> 15

<211> 3869

<212> DNA

<213> Microorganism

<220>

<221> CDS

<222> (241)... (3522)

<400> 15

lcatcgctac tggcaatcgg aticaaacaa atggctgcag ctgcacaga cgattgtgga 60
aagggaatat cigatttaac catacggcgg tgcgaltga tgaatagga ticgtggccg 120

15/27

```

cctaataattg aaagggggga tgcgtggagc agcgcatgca cggcgaggaa taactgttgt 180
tggagccctct aagtcattca tgtttagcaa acaaatctcg gtacgaaagg ggaaatgttt 240

atg tat gta agg aat cta aca ggt lca ttc cga ttt tct ctc tct ttt 288
Met Tyr Val Arg Asn Leu Thr Gly Ser Phe Arg Phe Ser Leu Ser Phe
1 5 10 15
ttg ctc tgt ttc tgt ctc ttc gtc ccc tct att tat gcc att gat ggt 336
Leu Leu Cys Phe Cys Leu Phe Val Pro Ser Ile Tyr Ala Ile Asp Gly
20 25 30
gtt tat cat gcg cca tac gga atc gat gat ctg tac gag att cag gcg 384
Val Tyr His Ala Pro Tyr Gly Ile Asp Asp Leu Tyr Glu Ile Gln Ala
35 40 45
acg gag cgg agt cca aga gat ccc gtt gca ggc gat act gtg tat atc 432
Thr Glu Arg Ser Pro Arg Asp Pro Val Ala Gly Asp Thr Val Tyr Ile
50 55 60
aag ata aca acg tgg ccc att gaa tca gga caa acg gct tgg gtg acc 480
Lys Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Ser Gly Gln Thr Ala Trp Val Thr
65 70 75 80
tgg acg aaa aac ggt gtc aat caa gct gct gtc gga gca gca ttc aaa 528
Trp Thr Lys Asn Gly Val Asn Gln Ala Ala Val Gly Ala Ala Phe Lys
85 90 95
tac aac agc ggc aac aac act tac tgg gaa gcg aac ctt ggc act ttt 576
Tyr Asn Ser Gly Asn Asn Thr Tyr Trp Glu Ala Asn Leu Gly Thr Phe
100 105 110
gca aaa ggg gac gtg atc agt tat acc gtt cat ggc aac aag gat ggc 624
Ala Lys Gly Asp Val Ile Ser Tyr Thr Val His Gly Asn Lys Asp Gly
115 120 125
gcg aat gag aag gtt atc ggt cct ttt act ttt acc gta acg gga tgg 672
Ala Asn Glu Lys Val Ile Gly Pro Phe Thr Phe Thr Val Thr Gly Trp
130 135 140
gaa tcc gtt agc agt atc agc tct att acg gat aat acg aac cgt gtt 720
Glu Ser Val Ser Ser Ile Ser Ser Ile Thr Asp Asn Thr Asn Arg Val
145 150 155 160
gtg ctg aat gcg gtg ccg aat aca ggc aca tlg aag cca aag atc aac 768
Val Leu Asn Ala Val Pro Asn Thr Gly Thr Leu Lys Pro Lys Ile Asn
165 170 175
cct tcc ttt acg gcg gat gat gtc ctc cgc gta cag gtt tct cca acc 816

```

Leu Ser Phe Thr Ala Asp Asp Val Leu Arg Val Gln Val Ser Pro Thr	
180 185 190	
gga aca gga acg tta agc agt gga ctt agt aat tac aca gtt tca gat	864
Gly Thr Gly Thr Leu Ser Ser Gly Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ser Asp	
195 200 205	
acc gcc ica acc act tgg ctt aca act tcc aag ctg aag gtg aag gtg	912
Thr Ala Ser Thr Thr Trp Leu Thr Thr Ser Lys Leu Lys Val Lys Val	
210 215 220	
gat aag aat cca ttc aaa ctt agt gtg tat aag cct gat gga acg acg	960
Asp Lys Asn Pro Phe Lys Leu Ser Val Tyr Lys Pro Asp Gly Thr Thr	
225 230 235 240	
tig att gcc cgt caa tat gac agc act acg aat cgt aac att gcc tgg	1008
Leu Ile Ala Arg Gln Tyr Asp Ser Thr Thr Asn Arg Asn Ile Ala Trp	
245 250 255	
tta acc aat ggc agt aca atc atc gac aag gia gaa gat cat ttt tat	1056
Leu Thr Asn Gly Ser Thr Ile Ile Asp Lys Val Glu Asp His Phe Tyr	
260 265 270	
tca ccg gct tcc gag gag ttt ttt ggc ttt gga gag cat tac aac aac	1104
Ser Pro Ala Ser Glu Glu Phe Phe Gly Phe Gly Glu His Tyr Asn Asn	
275 280 285	
ttc cgt aaa cgc gga aat gat gtg gac acc tat gtg ttc aac cag tat	1152
Phe Arg Lys Arg Gly Asn Asp Val Asp Thr Tyr Val Phe Asn Gln Tyr	
290 295 300	
aag aat caa aat gac cgc acc tac atg gca att cct ttt atg ctt aac	1200
Lys Asn Gln Asn Asp Arg Thr Tyr Met Ala Ile Pro Phe Met Leu Asn	
305 310 315 320	
agc agc ggt tat ggc att ttc gla aat tca acg tal tat tcc aaa ttt	1248
Ser Ser Gly Tyr Gly Ile Phe Val Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Lys Phe	
325 330 335	
cgg ttg gca acc gaa cgc acc gat atg ttc agc ttt acg gct gat aca	1296
Arg Leu Ala Thr Glu Arg Thr Asp Met Phe Ser Phe Thr Ala Asp Thr	
340 345 350	
ggg ggt agt gcc gcc tgc atg ctc gat tat tat ttc att tac ggt aat	1344
Gly Gly Ser Ala Ala Ser Met Leu Asp Tyr Tyr Phe Ile Tyr Gly Asn	
355 360 365	
gat ttg aaa aat gtc gtc agt aac tac gct aac att acc ggt aag cca	1392
Asp Leu Lys Asn Val Val Ser Asn Tyr Ala Asn Ile Thr Gly Lys Pro	

370	375	380	
aca gcg ctg ccg aaa tgg gct ttc ggg tta tgg atg tca gct aac gag			1440
Thr Ala Leu Pro Lys Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser Ala Asn Glu			
385	390	395	400
tgg gat cgt caa acc aag gig aat aca gcc att aat aac gcg aac tcc			1488
Trp Asp Arg Gln Thr Lys Val Asn Thr Ala Ile Asn Asn, Ala Asn Ser			
405	410	415	
aat aat att ccg gct aca gcg gtt gtg ctg gaa cag tgg agt gat gag			1536
Asn Asn Ile Pro Ala Thr Ala Val Val Leu Glu Gln Trp Ser Asp Glu			
420	425	430	
aac acg ttt tat att ttc aat gat gcc acc tat acc ccg aaa acg ggc			1584
Asn Thr Phe Tyr Ile Phe Asn Asp Ala Thr Tyr Thr Pro Lys Thr Gly			
435	440	445	
agt gct gcg cat gcc tat acc gat ttc act ttc ccg aca tct ggg aga			1632
Ser Ala Ala His Ala Tyr Thr Asp Phe Thr Phe Pro Thr Ser Gly Arg			
450	455	460	
tgg acg gat cca aaa gcg atg gca gac aat gtg cat aac aat ggg atg			1690
Trp Thr Asp Pro Lys Ala Met Ala Asp Asn Val His Asn Asn Gly Met			
465	470	475	480
aag ctg gtg ctt tgg cag gtc cct att cag aaa tgg act tca acg ccc			1728
Lys Leu Val Leu Trp Gln Val Pro Ile Gln Lys Trp Thr Ser Thr Pro			
485	490	495	
tat acc cag aaa gat aat gat gaa gcc tat atg acg gct cag aat tat			1776
Tyr Thr Gln Lys Asp Asn Asp Glu Ala Tyr Met Thr Ala Gln Asn Tyr			
500	505	510	
gca gtt ggc aac ggt agc gga ggc cag tac agg ata cct tca gga caa			1824
Ala Val Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gln Tyr Arg Ile Pro Ser Gly Gln			
515	520	525	
tgg ttc gag aac agt ttg ctg ctt gat ttt acg aat acg gcc gcc aaa			1872
Trp Phe Glu Asn Ser Leu Leu Leu Asp Phe Thr Asn Thr Ala Ala Lys			
530	535	540	
aac tgg tgg atg tct aaa cgc gct tat ctg ttt gat ggt gtg ggt atc			1920
Asn Trp Trp Met Ser Lys Arg Ala Tyr Leu Phe Asp Gly Val Gly Ile			
545	550	555	560
gac ggc ttc aaa aca gat ggc ggt gaa atg gta tgg ggt cgc tca aat			1968
Asp Gly Phe Lys Thr Asp Gly Gly Glu Met Val Trp Gly Arg Ser Asn			
565	570	575	

18/27

act ttc tca aac ggt aag aaa ggc aat gaa atg cgc aat caa tac ccg 2016
 Thr Phe Ser Asn Gly Lys Lys Gly Asn Glu Met Arg Asn Gln Tyr Pro
 580 585 590
 aat gag tat gtg aaa gcc tat aac gag tac gcg cgc tcg aag aaa gcc 2064
 Asn Glu Tyr Val Lys Ala Tyr Asn Glu Tyr Ala Arg Ser Lys Lys Ala
 595 600 605
 gat gcg gtc tcc ttt agc cgt tcc ggc acg caa ggc gca cag gcg aat 2112
 Asp Ala Val Ser Phe Ser Arg Ser Gly Thr Gln Gly Ala Gln Ala Asn
 610 615 620
 cag att ttc tgg tcc ggt gac caa gag tcg acg ttt ggt gct ttt caa 2160
 Gln Ile Phe Trp Ser Gly Asp Gln Glu Ser Thr Phe Gly Ala Phe Gln
 625 630 635 640
 caa gct gtg aat gca ggg ctt acg gca agt atg tct ggc gtt cct tat 2208
 Gln Ala Val Asn Ala Gly Leu Thr Ala Ser Met Ser Gly Val Pro Tyr
 645 650 655
 tgg agc tgg gat atg gca ggc ttt aca ggc act tat cca acg gct gag 2256
 Trp Ser Trp Asp Met Ala Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Pro Thr Ala Glu
 660 665 670
 ttt lac aaa cgt gct act gaa atg gct gct ttt gca ccg gtc atg cag 2304
 Leu Tyr Lys Arg Ala Thr Glu Met Ala Ala Phe Ala Pro Val Met Gln
 675 680 685
 ttt cat tcc gag tct aac ggc agc tct ggt atc aac gag gaa cgt tct 2352
 Phe His Ser Glu Ser Asn Gly Ser Ser Gly Ile Asn Glu Glu Arg Ser
 690 695 700
 cca tgg aac gca caa gcg cgt aca ggc gac aat acg atc att agt cat 2400
 Pro Trp Asn Ala Gln Ala Arg Thr Gly Asp Asn Thr Ile Ile Ser His
 705 710 715 720
 ttt gcc aaa tat acg aat acg cgc atg aat ttg ctt cct tat att tat 2448
 Phe Ala Lys Tyr Thr Asn Thr Arg Met Asn Leu Leu Pro Tyr Ile Tyr
 725 730 735
 agc gaa gcg aag atg gct agt gat act ggc gtt ccc atg atg cgc gcc 2496
 Ser Glu Ala Lys Met Ala Ser Asp Thr Gly Val Pro Met Met Arg Ala
 740 745 750
 atg gcg ctt gaa tat ccg aag gac acg aac acg tac ggt ttg aca caa 2544
 Met Ala Leu Glu Tyr Pro Lys Asp Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Thr Gln
 755 760 765
 cag tat atg ttc gga ggt aat tta ctt att gct cct gtt atg aat cag 2592

Gln Tyr Met Phe Gly Gly Asn Leu Leu Ile Ala Pro Val Met Asn Gln	
770 775 780	
gga gaa aca aac aag agi att tat ctt ccg cag ggg gat tgg atc gat	2640
Gly Glu Thr Asn Lys Ser Ile Tyr Leu Pro Gln Gly Asp Trp Ile Asp	
785 790 795 800	
ttc tgg ttc ggt gci cag cgt cct ggc ggt cga aca atc agc tac acg	2688
Phe Trp Phe Gly Ala Gln Arg Pro Gly Gly Arg Thr Ile Ser Tyr Thr	
805 810 815	
gcc ggc atc gat gat cta ccg gtt ttt gtg aag ttt ggc agt att ctt	2736
Ala Gly Ile Asp Asp Leu Pro Val Phe Val Lys Phe Gly Ser Ile Leu	
820 825 830	
ccg atg aat ttg aac gcg caa tat caa gtg ggc ggg acc att ggc aac	2784
Pro Met Asn Leu Asn Ala Gln Tyr Gln Val Gly Gly Thr Ile Gly Asn	
835 840 845	
agc ttg acg agc tac acg aat ctc gcg ttc cgc att tat ccg ctt ggg	2832
Ser Leu Thr Ser Tyr Thr Asn Leu Ala Phe Arg Ile Tyr Pro Leu Gly	
850 855 860	
aca aca acg tac gac tgg aat gat gat att ggc ggt tcg glg aaa acc	2880
Thr Thr Thr Tyr Asp Trp Asn Asp Asp Ile Gly Gly Ser Val Lys Thr	
865 870 875 880	
ata act tct aca gag caa tat ggg ttg aat aaa gaa acc gtg act gtt	2928
Ile Thr Ser Thr Glu Gln Tyr Gly Leu Asn Lys Glu Thr Val Thr Val	
885 890 895	
cca gcg att aat tct acc aag aca ttg caa gtg ttt acg act aag cct	2976
Pro Ala Ile Asn Ser Thr Lys Thr Leu Gln Val Phe Thr Thr Lys Pro	
900 905 910	
tcc tct gta acg gtg ggt ggt tct gtg atg aca gag tac agt act tta	3024
Ser Ser Val Thr Val Gly Gly Ser Val Met Thr Glu Tyr Ser Thr Leu	
915 920 925	
act gcc cta acg gga gcg tcg aca ggc tgg tac tat gat act gta cag	3072
Thr Ala Leu Thr Gly Ala Ser Thr Gly Trp Tyr Tyr Asp Thr Val Gln	
930 935 940	
aaa ttc act tac gtc aag ctt ggt tca agi gca tct gct caa tcc gtt	3120
Lys Phe Thr Tyr Val Lys Leu Gly Ser Ser Ala Ser Ala Gln Ser Val	
945 950 955 960	
gtg cta aat ggc gtt aat aag gtg gaa tat gaa gca gaa ttc ggc gtg	3168
Val Leu Asn Gly Val Asn Lys Val Glu Tyr Glu Ala Glu Phe Gly Val	


```

          965          970          975
caa agc ggc gti tca acg aac acg aac cat gca ggt tat act ggt aca 3216
Gln Ser Gly Val Ser Thr Asn Thr Asn His Ala Gly Tyr Thr Gly Thr
          980          985          990
gga ttt gig gac ggc ttt gag aci ctt gga gac aat gtt gct ttt gat 3264
Gly Phe Val Asp Gly Phe Glu Thr Leu Gly Asp Asn Val Ala Phe Asp
          995          1000          1005
gtt tcc gtc aaa gcc gca ggt act tat acg atg aag gtt cgg tat tca 3312
Val Ser Val Lys Ala Ala Gly Thr Tyr Thr Met Lys Val Arg Tyr Ser
          1010          1015          1020
tcc ggt gca ggc aat ggc tca aga gcc atc tat gtg aat aac acc aaa 3360
Ser Gly Ala Gly Asn Gly Ser Arg Ala Ile Tyr Val Asn Asn Thr Lys
          1025          1030          1035          1040
gtg acg gac ctt gcc ttg ccg caa aca aca agc tgg gat aca tgg ggg 3408
Val Thr Asp Leu Ala Leu Pro Gln Thr Thr Ser Trp Asp Thr Trp Gly
          1045          1050          1055
act gct acg ttt agc gtc tgg ctg agt aca ggt ctc aac acg gtg aaa 3456
Thr Ala Thr Phe Ser Val Ser Leu Ser Thr Gly Leu Asn Thr Val Lys
          1060          1065          1070
gtc agc tat gat ggt acc agt tca ctt ggc att aat ttc gat aac atc 3504
Val Ser Tyr Asp Gly Thr Ser Ser Leu Gly Ile Asn Phe Asp Asn Ile
          1075          1080          1085
gcg att gta gag caa taa 3522
Ala Ile Val Glu Gln
          1090
aaggicggga gggcaagtc ctcctttaat ttctaatacga aaggagat ccttgatgcg 3582
tccaccaaac aaagaaattc cacgtattct tgcttttttt acagcgitta cgttgtttgg 3642
ttcaaccctt gccitgcttc ctgctccgcc tgcgcatgcc taatcagca gcctaggaaa 3702
tcicatttct tcgagigtca ccggagatcc ctigacgcta acgttgata acggtgcgga 3762
gccgagtgat gacccttga ttgttcaagc ggtgcaaac ggtatttga aggtggatta 3822
tcgtccaaat agcataacgc cgagcgcgaa gacgccgatg ctggatc 3869

```

<210> 16

<211> 4986

<212> DNA

<213> Microorganism

<220>

<221> CDS

<222> (667).. (3948)

<400> 16

```

gagctcggga agaaccgct cctgcaagct tggacgcagg cggiggagga ggccgggagc 60
tacatcgctt ccgctatggc aggggcctggg ggaggctgat acggcttgat cggccacigc 120
iggggagggc tgcctggcgt cgagaccggc cacctggcga aggcctggcg gatgcaggag 180
ccgacgcata tcttcgtgtc cgggtgcagg ccgccccatc tgcigcaagc gcggccggac 240
ttgggaacgg gaccatccgg cccggcctcg cccccgatg ccigccgat cgcccaagcg 300
taccgtatgc ctccaggcg cgggcccgtg ctgcccggc tgagtgtatt cggcgccgc 360
cgagaccggg gcgtgtatgt ggatagtgt gccgaatggg gccgctatac ggcccgcata 420
tgcgatgttc atattggcga gggcgggcat gcagatggg gacctgatc agaccgttg 480
ctgccattcg tgcgaatgat tgcggagagg gaatatcgt ctcttgaag ccaggigacc 540
tcagataaga tctgcacta agctgtatag ttccggaagg gaggtaggc agagaagcg 600
acatgagcti gtagcttga cgtttaacgg tcaaaaccaa ttttactttg ggaaggagca 660
agattt atg cat gga aga aac ala ccg aga ccc atc aag ctc att gtt 708
Met His Gly Arg Asn Ile Pro Arg Pro Ile Lys Leu Ile Val
      1           5           10
tct tgg ctg ctg att ttc ttt tta atg gtg cca agc atc tat gca att 756
Ser Trp Leu Leu Ile Phe Phe Leu Met Val Pro Ser Ile Tyr Ala Ile
      15           20           25           30
gac ggc gta tac cac gcg cct tac ggg atc gac gat ctt tat gag att 804
Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Tyr Gly Ile Asp Asp Leu Tyr Glu Ile
           35           40           45
cag gcg acg gag cgc agt ccg aga gac cct gtg gcc ggg gag acg gtg 852
Gln Ala Thr Glu Arg Ser Pro Arg Asp Pro Val Ala Gly Glu Thr Val
           50           55           60
tat atc aaa atc aca aca tgg ccg atc gag ccc gga cag acg gca tgg 900
Tyr Ile Lys Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Pro Gly Gln Thr Ala Trp
           65           70           75
gtg acc tgg acg aaa aac ggc gtc gcc cag ccg gcg gtc ggt gcc gcc 948
Val Thr Trp Thr Lys Asn Gly Val Ala Gln Pro Ala Val Gly Ala Ala
           80           85           90
tac aag tac aac agc ggc aac aac acc tac tgg gag gcg aac ctg ggc 996
Tyr Lys Tyr Asn Ser Gly Asn Asn Thr Tyr Trp Glu Ala Asn Leu Gly
           95           100           105           110

```

agc ttc gcc aaa gga gac gta att tcc tac acc gti cgc ggc aat aag 1044
 Ser Phe Ala Lys Gly Asp Val Ile Ser Tyr Thr Val Arg Gly Asn Lys
 115 120 125
 gac ggt gcc aat gaa aaa acg gcc gga ccg ttc acc ttt acc gta acc 1092
 Asp Gly Ala Asn Glu Lys Thr Ala Gly Pro Phe Thr Phe Thr Val Thr
 130 135 140
 gac tgg gaa tac gtc agc agc atc ggc tgc gtc acg aat aac acg aac 1140
 Asp Trp Glu Tyr Val Ser Ser Ile Gly Ser Val Thr Asn Asn Thr Asn
 145 150 155
 cgt gtc ctg ctg aat gcg gig ccg aac acg ggg acg ctg tcc ccc aag 1188
 Arg Val Leu Leu Asn Ala Val Pro Asn Thr Gly Thr Leu Ser Pro Lys
 160 165 170
 atc aac att tgc ttc acg gcg gac gat gig ttc cgc gtt cag ctg tcc 1236
 Ile Asn Ile Ser Phe Thr Ala Asp Asp Val Phe Arg Val Gln Leu Ser
 175 180 185 190
 cct acg gga tgc ggg acg ttg agc acg ggc ctg agt aat ttt acc gtc 1284
 Pro Thr Gly Ser Gly Thr Leu Ser Thr Gly Leu Ser Asn Phe Thr Val
 195 200 205
 acg gac agt gcg tcc acg gcc tgg atc tct aca tcc aaa tta aag ctg 1332
 Thr Asp Ser Ala Ser Thr Ala Trp Ile Ser Thr Ser Lys Leu Lys Leu
 210 215 220
 aag gtg gat aag aat ccg ttc aaa ctg agc gtg tac aag ccg gac ggc 1380
 Lys Val Asp Lys Asn Pro Phe Lys Leu Ser Val Tyr Lys Pro Asp Gly
 225 230 235
 acg acg ctg atc gcg cgc cag tat gac agc acg gcc aac cgc aat ctg 1428
 Thr Thr Leu Ile Ala Arg Gln Tyr Asp Ser Thr Ala Asn Arg Asn Leu
 240 245 250
 gct tgg ctg acc aat ggc agc act gtc atc aat aaa atc gag gac cac 1476
 Ala Trp Leu Thr Asn Gly Ser Thr Val Ile Asn Lys Ile Glu Asp His
 255 260 265 270
 ttc tac tgc ccg gcg tcc gag gag ttt ttc ggc ttc ggg gag cgc tac 1524
 Phe Tyr Ser Pro Ala Ser Glu Glu Phe Phe Gly Phe Gly Glu Arg Tyr
 275 280 285
 aac aac ttc cgc aag cgc gga acc gac gtg gac acg tat gtc tac aat 1572
 Asn Asn Phe Arg Lys Arg Gly Thr Asp Val Asp Thr Tyr Val Tyr Asn
 290 295 300
 cag tac aaa aat caa aac gac cgc acc tat atg gca atc ccc ttc atg 1620

Gln Tyr Lys Asn Gln Asn Asp Arg Thr Tyr Met Ala Ile Pro Phe Met	
305 310 315	
ctg aac agc agc ggg tac ggt atc ttc gta aac tcc acg tac tac tcc	1668
Leu Asn Ser Ser Gly Tyr Gly Ile Phe Val Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser	
320 325 330	
aaa ttc cgc ttg gca act gag cgc tcc gat atg tac agt ttt acg gcc	1716
Lys Phe Arg Leu Ala Thr Glu Arg Ser Asp Met Tyr Ser Phe Thr Ala	
335 340 345 350	
gat acc ggg ggc agc gcc aat tgc acg ctg gat tac tac ttt att tac	1764
Asp Thr Gly Gly Ser Ala Asn Ser Thr Leu Asp Tyr Tyr Phe Ile Tyr	
355 360 365	
ggc aat gac ttg aag ggc gtc gtc agc aat tat gcg aac atc aca ggc	1812
Gly Asn Asp Leu Lys Gly Val Val Ser Asn Tyr Ala Asn Ile Thr Gly	
370 375 380	
aag ccg gct gct ctg ccc aaa tgg gcg ttt ggc ctc tgg atg tgc gcc	1860
Lys Pro Ala Ala Leu Pro Lys Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser Ala	
385 390 395	
aat gag tgg gac cgg caa tcc aaa gta gcg act gcg atc aat aac gcc	1908
Asn Glu Trp Asp Arg Gln Ser Lys Val Ala Thr Ala Ile Asn Asn Ala	
400 405 410	
aat acg aac aac atc ccg gcg acg gcc gtc gtg ctg gag cag tgg agt	1956
Asn Thr Asn Asn Ile Pro Ala Thr Ala Val Val Leu Glu Gln Trp Ser	
415 420 425 430	
gac gag aat acg ttc tat atg ttc aac gat gcg cag tat acg gcc aaa	2004
Asp Glu Asn Thr Phe Tyr Met Phe Asn Asp Ala Gln Tyr Thr Ala Lys	
435 440 445	
cct ggc ggc agc aca cac tcc tat acg gac tat atc ttc ccg gcg gcc	2052
Pro Gly Gly Ser Thr His Ser Tyr Thr Asp Tyr Ile Phe Pro Ala Ala	
450 455 460	
ggc cgt tgg ccg aat ccg aag caa atg gcg gat aat gta cac agt aac	2100
Gly Arg Trp Pro Asn Pro Lys Gln Met Ala Asp Asn Val His Ser Asn	
465 470 475	
ggg atg aag ctg gtg ctg tgg cag gtg ccg att cag aaa tgg acc gcc	2148
Gly Met Lys Leu Val Leu Trp Gln Val Pro Ile Gln Lys Trp Thr Ala	
480 485 490	
gct cct cat ctg cag aag gac aac gac gaa agc tat atg atc gcg caa	2196
Ala Pro His Leu Gln Lys Asp Asn Asp Glu Ser Tyr Met Ile Ala Gln	

495	500	505	510	
aat tai gcc gia ggc aac ggc agc gga ggc cag tac cgc atc cct agc				2244
Asn Tyr Ala Val Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gln Tyr Arg Ile Pro Ser				
	515	520	525	
ggg caa tgg ttt gag aac agc ctg ctg ctg gac ttc acg aac ccg agc				2292
Gly Gln Trp Phe Glu Asn Ser Leu Leu Leu Asp Phe Thr Asn Pro Ser				
	530	535	540	
gcc aaa aac tgg tgg atg tcc aag cgc gcc tai ctg ttt gat ggc gtc				2340
Ala Lys Asn Trp Trp Met Ser Lys Arg Ala Tyr Leu Phe Asp Gly Val				
	545	550	555	
ggc atc gac ggg ttc aag acg gac gga ggg gag atg gtc tgg ggc cgc				2388
Gly Ile Asp Gly Phe Lys Thr Asp Gly Gly Glu Met Val Trp Gly Arg				
	560	565	570	
tgg aac acg ttc gcc aat ggc aaa aaa ggc gat gaa atg cgc aac cag				2436
Trp Asn Thr Phe Ala Asn Gly Lys Lys Gly Asp Glu Met Arg Asn Gln				
	575	580	585	590
tac ccg aac gat tac gtg aag gcc tac aac gaa tai gcg cgc tcg aag				2484
Tyr Pro Asn Asp Tyr Val Lys Ala Tyr Asn Glu Tyr Ala Arg Ser Lys				
	595	600	605	
aaa agc gat gcc gtc agc ttc agc cgt tcg ggc acg caa ggg gcg caa				2532
Lys Ser Asp Ala Val Ser Phe Ser Arg Ser Gly Thr Gln Gly Ala Gln				
	610	615	620	
gcg aat cag atc ttc tgg tcc ggt gac cag gaa tcg acg ttc ggt gcc				2580
Ala Asn Gln Ile Phe Trp Ser Gly Asp Gln Glu Ser Thr Phe Gly Ala				
	625	630	635	
ttc cag caa gcc gtc cag gcg gga ctg acc gca ggc ttg tcc ggc gtt				2628
Phe Gln Gln Ala Val Gln Ala Gly Leu Thr Ala Gly Leu Ser Gly Val				
	640	645	650	
ccg tai tgg agc tgg gac ttg gct gga ttc acc ggc gct tai ccg tcg				2676
Pro Tyr Trp Ser Trp Asp Leu Ala Gly Phe Thr Gly Ala Tyr Pro Ser				
	655	660	665	670
gcc gag cta tai aaa cgc gcg acg gca atg tcg gca ttt gcc ccg att				2724
Ala Glu Leu Tyr Lys Arg Ala Thr Ala Met Ser Ala Phe Ala Pro Ile				
	675	680	685	
atg cag ttc cac tcc gaa gcc aac ggc agt tcc ggc atc aat gag gag				2772
Met Gln Phe His Ser Glu Ala Asn Gly Ser Ser Gly Ile Asn Glu Glu				
	690	695	700	

cgg tcc ccg tgg aat gct cag gcc cgg act ggc gac aac acg atc atc	2820
Arg Ser Pro Trp Asn Ala Gln Ala Arg Thr Gly Asp Asn Thr Ile Ile	
705 710 715	
agc cat ttt gcc aag tat acg aac acc cgg atg aac ctg ctt cct tat	2868
Ser His Phe Ala Lys Tyr Thr Asn Thr Arg Met Asn Leu Leu Pro Tyr	
720 725 730	
att tac agc gag gct aaa gca gca agc gat act ggc gtg ccg atg atg	2916
Ile Tyr Ser Glu Ala Lys Ala Ala Ser Asp Thr Gly Val Pro Met Met	
735 740 745 750	
cgc gcg atg gcg ctg gag tat ccg agc gat acc cag acg tac gga ttg	2964
Arg Ala Met Ala Leu Glu Tyr Pro Ser Asp Thr Gln Thr Tyr Gly Leu	
755 760 765	
acg cag cag tac atg ttc ggc ggc agc ctg ctg gtg gcg cct gtc ttg	3012
Thr Gln Gln Tyr Met Phe Gly Gly Ser Leu Leu Val Ala Pro Val Leu	
770 775 780	
aac caa ggc gag acg aat aag aat atc tac ctt ccg caa gga gat igg	3060
Asn Gln Gly Glu Thr Asn Lys Asn Ile Tyr Leu Pro Gln Gly Asp Trp	
785 790 795	
atc gac ttc igg ttc ggc gcg cag cgt ccg ggc ggc cga acg atc agc	3108
Ile Asp Phe Trp Phe Gly Ala Gln Arg Pro Gly Gly Arg Thr Ile Ser	
800 805 810	
tac tac gcg ggc gtg gac gat ctt ccc gtc ttc gtg aag tcc ggc agc	3156
Tyr Tyr Ala Gly Val Asp Asp Leu Pro Val Phe Val Lys Ser Gly Ser	
815 820 825 830	
atc ctg ccg atg aat ctg aac ggg cag tat cag gtt ggc ggc acg atc	3204
Ile Leu Pro Met Asn Leu Asn Gly Gln Tyr Gln Val Gly Gly Thr Ile	
835 840 845	
ggc aac agc ttg acc gcc tac aac aac ctg acg ttc ccg att tat cca	3252
Gly Asn Ser Leu Thr Ala Tyr Asn Asn Leu Thr Phe Arg Ile Tyr Pro	
850 855 860	
ctg ggt acg acg acg tac agc tgg aat gat gac atc ggc ggc tcg gtg	3300
Leu Gly Thr Thr Thr Tyr Ser Trp Asn Asp Asp Ile Gly Gly Ser Val	
865 870 875	
aag acg att acg tcg aca gag cag tat gga ctg aat aaa gag acg gtg	3348
Lys Thr Ile Thr Ser Thr Glu Gln Tyr Gly Leu Asn Lys Glu Thr Val	
880 885 890	
acg ctt ccg gcg atc aac tcg gcg aag acg ctc cag gtg ttc acg acc	3396

Thr Leu Pro Ala Ile Asn Ser Ala Lys Thr Leu Gln Val Phe Thr Thr
 895 900 905 910
 aag ccg tcg tcg gtg acg ctc ggc ggc acg gcc ctc acc gcg cat agc 3444
 Lys Pro Ser Ser Val Thr Leu Gly Gly Thr Ala Leu Thr Ala His Ser
 915 920 925
 aca tta agc gca ttg atc ggc gct tcc tcc ggc tgg tat tac gat acg 3492
 Thr Leu Ser Ala Leu Ile Gly Ala Ser Ser Gly Trp Tyr Tyr Asp Thr
 930 935 940
 gig caa aag ctc gcc tat gtg aag ctc ggc gcc agc tca tcg gcg caa 3540
 Val Gln Lys Leu Ala Tyr Val Lys Leu Gly Ala Ser Ser Ser Ala Gln
 945 950 955
 acc gtc gtg ctt gac ggc gtc aac aag gtc gag tat gag gct gag ttc 3588
 Thr Val Val Leu Asp Gly Val Asn Lys Val Glu Tyr Glu Ala Glu Phe
 960 965 970
 ggc aca ctt acc ggc gtc acg acc aat acg aat cat gcc ggc tat atg 3636
 Gly Thr Leu Thr Gly Val Thr Thr Asn Thr Asn His Ala Gly Tyr Met
 975 980 985 990
 ggt acc ggc ttt gtc gac ggc ttc gat gcg gca ggc gat gca gig acc 3684
 Gly Thr Gly Phe Val Asp Gly Phe Asp Ala Ala Gly Asp Ala Val Thr
 995 1000 1005
 ttc gac gta tcc gtc aaa gcg gcc ggc acg tat gcg ctc aag gtc cgg 3732
 Phe Asp Val Ser Val Lys Ala Ala Gly Thr Tyr Ala Leu Lys Val Arg
 1010 1015 1020
 tac gct tcc gct ggt ggc aac gct tca cgc gct atc tat gtc aac aac 3780
 Tyr Ala Ser Ala Gly Gly Asn Ala Ser Arg Ala Ile Tyr Val Asn Asn
 1025 1030 1035
 gcc aag gtg acc gat ctg gcg ctt ccg gca acg gcc aac tgg gac acc 3828
 Ala Lys Val Thr Asp Leu Ala Leu Pro Ala Thr Ala Asn Trp Asp Thr
 1040 1045 1050
 tgg ggg acg gca acc gtc aac gta gcc tta aac gcc ggc tac aac tcg 3876
 Trp Gly Thr Ala Thr Val Asn Val Ala Leu Asn Ala Gly Tyr Asn Ser
 1055 1060 1065 1070
 atc aag gtc agc tac gac aac acc aat acg ctc ggc att aat ctc gat 3924
 Ile Lys Val Ser Tyr Asp Asn Thr Asn Thr Leu Gly Ile Asn Leu Asp
 1075 1080 1085
 aac att gcg atc gig gag cat tga 3948
 Asn Ile Ala Ile Val Glu His

1090

cagcaggaat cticgcgagg aatgagtiag cgaagagtic atgcaggcag aggggtiacc 4008
cataatigia aagcccggcg cagccaggca ccaagiatgc ccgggagggc cgccggccci 4068
ccctttatit caatgatgaa aggcggcatc gataigggtc taiggaacaa acgagtcact 4128
cgcatctcti ccgtactcgc agcaagcgcg ctgatcggct ctaccgtacc ttctctagcg 4188
ccaccicccg cicaagccca tgtgagcgcg ctgggcaacc tgciticcic ggcgglgacc 4248
ggggatagc tcacgcigac gatcgataac ggcgcggaac cgaatgacga taitctagti 4308
ctgcaagcag tcagaacgg taticgaag gtggactacc ggccgaacgg ttagcticca 4368
agcgcggaia cgccgatgct ggalcccaat aaaacciggc cgtccatagg cgccgtiatic 4428
aatacagcct ctaatccgat gacgatacaca acgcccggcg igaagatiga gatlgccaaa 4488
aatccggigc gccigaccgt gaaaaaacg gacggcaccg ctctgttiatg ggaacccccg 4548
accggcgcg tcttctcgga cggcgiccg tictlgcacg ggacggcgca caataigiac 4608
ggcatccgca gcttcaatgc tttgacagc ggcggggac tgcitcgcaa cagctccacc 4668
caagccgccc gtgcaggcga ccagggaac tccggcggcc cgctgaictg gagcacagcc 4728
gggtacgggg tgcitgtiga cagcgacggt gggtatccgt tcacggacga ggctaccggc 4788
aagctggagi tctattacgg cggcacgcct ccggaaggcc ggcgctatac gaagcaggat 4848
gtggagtiac acatcaigct cggcacgccg aaagagatca tgcicggcgt cggggaaati 4908
acgggcaaac cgccgatgct gcccaagtgg tcccgggct ttatgaacti cgagtgggat 4968
ctgaatgaag ctgagctc 4986

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10044

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 9/24, C12N15/56, C12N1/21, C12P19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 9/24, C12N15/56, C12N1/21, C12P19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5786196 A (The United States of America as Represented by the Secretary of Agriculture), 28 June, 1998 (28.06.1998) (Family: none)	1-16
A	US 5888776 A (The United States of America as Represented by the Secretary of Agriculture), 30 April, 1999 (30.04.1999) (Family: none)	1-16
A	US 5889179 A (The United States of America as Represented by the Secretary of Agriculture), 30 April, 1999 (30.04.1999) (Family: none)	1-16
A	EP 606753 A (Hayashibara Biochem. Lab., Inc.), 20 July, 1994 (20.07.1994), & US 5455168 A & JP 7-143876 A	1-16
A	Gregory L. COTE et al., "Enzymically produced cyclic α -1,3-linked and α -1,6-linked oligosaccharides of D-glucose", Eur. J. Biochem., (1994), Vol.226, No.2, pages 641 to 648	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
18 January, 2002 (18.01.02)Date of mailing of the international search report
29 January, 2002 (29.01.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10044

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	H. A. WYCKOFF et al., "Isolation and Characterization of Microorganisms with Alternan Hydrolytic Activity", Current Microbiology, (1996), Vol.32, No.6, pages 343 to 348	1-16

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/10044

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 9/24, C12N15/56, C12N1/21, C12P19/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 9/24, C12N15/56, C12N1/21, C12P19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 5786196 A (The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture) 1998.06.28 ファミリーなし	1-16
A	US 5888776 A (The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture) 1999.04.30 ファミリーなし	1-16
A	US 5889179 A (The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture) 1999.04.30 ファミリーなし	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.01.02

国際調査報告の発送日

29.01.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 606753 A (株式会社林原生物化学研究所) 1994. 07. 20 & US 5455168 A & JP 7-143876 A	1 - 1 6
A	Gregory L. COTE et al. Enzymically produced cyclic α -1,3-linked and α -1,6-linked oligosaccharides of D-glucose. Eur. J. Biochem. 1994, Vol. 226, No. 2, p. 641-648	1 - 1 6
A	H. A. WYCKOFF et al. Isolation and Characterization of Microorganisms with Alternan Hydrolytic Activity. CURRENT MICROBIOLOGY 1996, Vol. 32, No. 6, p. 343-348	1 - 1 6